

Einfluss von spinalem Prostaglandin E₂ und Indomethacin auf
die Antworten nozizeptiver Rückenmarkneuronen auf N-methyl-
D-aspartat (NMDA) und
 α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-propionsäure (AMPA)

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Barbara Klein
geboren am 13.09.1977 in Kulmbach

Gutachter

1. Prof. Dr. H.-G. Schaible, Universitätsklinikum Jena, Institut für Physiologie/Abt. Neurophysiologie
2. PD Dr. R. Bauer, Universitätsklinikum Jena, Pathophysiologisches Labor
3. Prof. Dr. W. Jänig, Universitätsklinikum Kiel, Physiologisches Institut

Tag der öffentlichen Verteidigung:
06.03.2007

Verzeichnis der Abkürzungen

AMPA	α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-propionsäure
CGRP	Calcitonin gene-related peptide
COX1/2	Cyclooxygenase 1/2
DRG	Dorsal root ganglion
EP ₁₋₄	E-Prostaglandinrezeptoren 1-4
HT-Neuron	High-threshold neuron
IP ₃	Inositoltriphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NMDA	N-methyl-D-aspartat
NO	Stickstoffmonoxid
NSAID	Non-steroidal anti-inflammatory drugs
PGD	Prostaglandin D
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PGF	Prostaglandin F
WDR-Neuron	Wide-dynamic-range neuron

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der Abkürzungen.....	3
Inhaltsverzeichnis.....	4
Zusammenfassung.....	5
Kapitel 1: Einleitung.....	8
1.1 Bedeutung und Definition von Schmerz und Nozizeption.....	8
1.2 Nozizeptoren und „Schmerzweiterleitung“.....	8
1.3.1 Periphere Sensibilisierung.....	14
1.3.2 Zentrale Sensibilisierung.....	15
1.3.2.1 Kennzeichen der zentralen Sensibilisierung.....	15
1.3.2.2 Die Bedeutung von NMDA und AMPA–Rezeptoren für die zentrale Sensibilisierung.....	15
1.4 Prostaglandine.....	18
1.5 Fragestellung: Welche Beteiligung haben Prostaglandine am entzündungsbedingten Schmerz?.....	22
Kapitel 2: Methode und Material.....	23
2.1 Herstellung der Elektrode.....	23
2.1.1 Herstellung der Carbonfaserelektrode.....	24
2.1.2 Herstellung der Mehrfachelektrode.....	25
2.1.3 Applikationslösungen.....	26
2.1.4 Verbinden von Carbonfaser- und Mehrfachelektrode.....	26
2.2 Präparation der Versuchstiere.....	27
2.2.1 Narkose und Überwachung der Vitalparameter.....	27
2.2.2 Laminektomie und Fixierung der Versuchstiere.....	28
2.2.3 Einbringen der Ratte in den Versuchsaufbau.....	28
2.2.4 Induktion einer Kniegelenkentzündung.....	29
2.3 Versuchsaufbau.....	29
2.3.1 Iontophorese.....	29
2.3.2 Extrazelluläre Ableitung.....	31

2.3.3 Datenaufzeichnung.....	31
2.4 Versuchsvorbereitung.....	32
2.4.1 Geeignete Neurone.....	32
2.4.2 Qualität des gefundenen Neurons.....	32
2.4.3 Antwortverhalten auf AMPA und NMDA.....	33
2.5 Versuchsablauf.....	33
2.5.1 Abwechselnde Applikation von AMPA und NMDA.....	33
2.5.2 Protokoll.....	33
2.5.3 Dokumentation und Statistik.....	34
2.5.4 Substanzen.....	35
Kapitel 3: Ergebnisse.....	36
3.1 Charakteristika der Neurone.....	36
3.2 Einfluss von PGE ₂ auf das Antwortverhalten auf AMPA und NMDA.....	39
3.2.1 Versuchstiere mit normalem Knie.....	39
3.2.2 Versuchstiere mit entzündetem Knie.....	41
3.3 Wirkung von Indomethacin auf das Antwortverhalten der Neurone auf AMPA und NMDA bei Tieren mit entzündetem Knie.....	44
Kapitel 4: Diskussion.....	46
4.1 Diskussion der Methode.....	46
4.2 Wirkung von PGE ₂ auf die Antwort von AMPA und NMDA.....	47
4.2.1 Wirkung von exogen appliziertem PGE ₂	48
4.2.2 Hemmung der endogenen PGE ₂ -Synthese durch Indomethacin.....	50
4.3 Ausblick.....	52
Quellen.....	53
Anhang.....	64
Danksagung.....	64
Lebenslauf.....	65
Ehrenwörtliche Erklärung.....	66

Zusammenfassung

Nozizeptive Gelenkafferenzen ziehen zum Rückenmark, wo die erste synaptische Übertragung in den Hinterhörnern des Rückenmarks stattfindet. An dieser wichtigen Umschaltstelle kann die Information wesentlich moduliert werden. Als exzitatorischer Transmitter an der erregenden Synapse im Rückenmark dient die Aminosäure Glutamat, die ionotrope AMPA- und NMDA-Rezeptoren aktiviert. AMPA- und NMDA-Rezeptoren werden bei noxischer Reizung des Gelenkes synergistisch aktiviert, und insbesondere den NMDA-Rezeptoren wird eine wichtige Rolle bei der entzündungsbedingten „zentralen Sensibilisierung“ zugeschrieben. Zentrale Sensibilisierung besagt, dass spinale Neurone übererregbar werden und daher bei nozizeptivem Eingang größere Antworten als unter Kontrollbedingungen aufweisen. Zusammen mit der Sensibilisierung von nozizeptiven Primärafferenzen (periphere Sensibilisierung) stellt die zentrale Sensibilisierung eine wichtige neuronale Grundlage für entzündungsbedingten Gelenkschmerz dar.

Ziel ist es, die Vorgänge im Rückenmark bei entzündlichem Gelenkschmerz weiter aufzuklären. Dabei ist ein Hauptinteresse, die Wirkung der spinalen Prostaglandine bei der synaptischen Verarbeitung von nozizeptivem Input aus dem normalen und entzündeten Knie und ihre Rolle bei der zentralen Sensibilisierung zu charakterisieren. Es ist bekannt, dass bei einer peripheren Entzündung die mRNA für Cyclooxygenase-2 (COX-2), die Menge an COX-2 Protein und die Freisetzung von Prostaglandin E₂ im Rückenmark ansteigen, und dass Prostaglandine die Freisetzung von Substanz P, CGRP, Glutamat und Aspartat im Rückenmark erhöhen. In elektrophysiologischen Experimenten wurde gefunden, dass spinal applizierte Prostaglandine die Antworten spinaler Neurone auf mechanische Reizung des Kniegelenks erhöhen und ein Bild der spinalen Übererregbarkeit erzeugen. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, inwieweit spinale Prostaglandine die Aktivierung glutamaterger AMPA- und NMDA-Rezeptoren im Rückenmark beeinflussen.

In narkotisierten Ratten wurden extrazelluläre elektrophysiologische Ableitungen von Rückenmarkszellen in vivo mit der Applikation von AMPA und NMDA mittels Microiontophorese kombiniert. Durch die Ionophorese kann die Transmitterfreisetzung im Rückenmark initiiert werden. Substanzen wurden mit Hilfe von Mehrkanalpipetten in die unmittelbare Nähe des zu untersuchenden Neurons gebracht, und gleichzeitig wurde die Aktivierung des untersuchten Neurons gemessen. Untersucht wurden nozizeptive Neurone mit Einstrom vom Kniegelenk. Diese Neurone antworteten auf Druckreize, die auf das

Kniegelenk appliziert wurden. Die Neurone wurden durch eine abwechselnde, microiontophoretische Applikation von NMDA und AMPA erregt. In den Experimenten wurde getestet, ob sich die Antworten der Neurone durch das Aufbringen von PGE₂ auf das Rückenmark im Vergleich zur Kontrolle mit Tyrode verändern. Die Untersuchung wurde an normalen Tieren und an Tieren mit akuter Kniegelenkentzündung durchgeführt.

Eine Applikation von PGE₂ auf das Rückenmark führte in Neuronen des normalen Tieres zu einer signifikanten Erhöhung der Antworten auf NMDA; sie beeinflussten die Antworten auf AMPA dagegen nicht. Bei Tieren mit entzündetem Knie jedoch stiegen nach PGE₂-Applikation sowohl die Antworten auf AMPA als auch auf NMDA. Des Weiteren sollte in Tieren mit akuter Kniegelenkentzündung der Einfluss von endogenem Prostaglandin auf die neuronalen Antworten von AMPA und NMDA überprüft werden. Bei Tieren mit entzündeten Kniegelenken wurde Indomethacin, ein Hemmer der Prostaglandinsynthese, auf das Rückenmark aufgebracht. Unter Indomethacin ergab sich keine Veränderung der neuronalen Antworten auf AMPA und NMDA.

Die Applikation von PGE₂ auf das Rückenmark ahmt eine zentrale Sensibilisierung für mechanische Reize auf das Kniegelenk nach, wie sie infolge einer Kniegelenkentzündung entstehen kann. Da NMDA-Rezeptoren eine wesentliche Rolle bei der Entstehung dieser zentralen Sensibilisierung für mechanische Reize spielen, könnten nach den vorliegenden Daten Prostaglandine über eine Verstärkung der Effekte an NMDA-Rezeptoren an dieser zentralen Sensibilisierung mitwirken. Während einer Entzündung wurden AMPA- und NMDA- Antworten durch gleichzeitige PGE₂-Applikation erhöht. Diese Befunde zeigen, dass bei Gelenkentzündungen die glutamaterge synaptische Übertragung prinzipiell durch PGE₂ beeinflusst werden kann, aber die fehlende Wirkung von Indomethacin auf die Antworten auf AMPA und NMDA stellt in Frage, ob endogenes Prostaglandin 7-11 Stunden nach Entzündungsinduktion über eine Interaktion mit AMPA- und NMDA-Rezeptoren an der Aufrechterhaltung der zentralen Sensibilisierung beteiligt ist. In diesem Zeitintervall wurden nach Daten von Vasquez et al. (2001) auch die Antworten auf mechanische Reizung des entzündeten Kniegelenkes durch spinale Indomethacin nicht reduziert, wohl aber durch systemisch gegebenes Indomethacin.

Kapitel 1: Einleitung

1.1 Bedeutung und Definition von Schmerz und Nozizeption

Die Fähigkeit Schmerz zu empfinden, ist eine lebenserhaltende biologische Funktion unseres Organismus, was sich vor allem bei Patienten mit kongenitaler Schmerzunempfindlichkeit zeigt. Bei ihnen kommt es auf Dauer zu schweren Läsionen der Haut und der Gelenke. Insgesamt hat das eine geringere Lebenserwartung zur Folge (Brand et al. 1993). Andererseits können chronische Schmerzzustände zu Depressionen und sogar zu Suizid führen (Smith et al. 2004).

Von der Kommission der „International Association for the Study of Pain“ wird Schmerz so definiert: „Schmerz ist eine unangenehme, sensorische und emotionale Erfahrung, die in Verbindung mit tatsächlichen oder drohenden Gewebeschädigungen auftritt oder in Begriffen solcher Gewebeschädigungen beschrieben wird.“ Deshalb ist es die Aufgabe des Arztes Schmerzen zu bekämpfen, wobei aber die Fähigkeit Schmerz zu empfinden, erhalten bleiben muss.

Man unterscheidet Schmerz und Nozizeption. Schmerz ist eine subjektive Empfindung, die vom Bewusstsein abhängig ist und durch mannigfaltige Faktoren beeinflusst wird. Derartige Empfindungen sind schwer messbar. Unter Nozizeption versteht man die Summe der neuronalen Prozesse, die an der Weiterleitung und Verarbeitung von Informationen, die durch schmerzhafte Reize hervorgerufen werden, beteiligt sind. Nozizeptive Prozesse kann man in naturwissenschaftlichen Experimenten untersuchen, z. B. durch die Registrierung von neuronaler Aktivität. Sie sind prinzipiell auch in Narkose, also unabhängig vom Bewusstsein messbar.

1.2 Nozizeptoren und „Schmerzweiterleitung“

Die Bezeichnung Nozizeptor leitet sich von dem lateinischen Verb „nocere“, schaden, ab und wurde von Sir Charles Sherrington 1906 eingeführt. Nozizeptoren bezeichnen afferente Neurone, welche Reize kodieren, die die Integrität des Körpers bedrohen. Die nozizeptiven Afferenzen gehören zu den langsam leitenden Nervenfasern. Eine

Gruppe gehört zu den dünnen, markhaltigen A δ -Fasern mit einer Leitungsgeschwindigkeit von 2,5-20 m/s. Die andere Gruppe gehört zu den marklosen C-Fasern mit einer Leitungsgeschwindigkeit von 0,5-2,5 m/s (siehe Review Article von Schaible und Grubb 1993). Diese Fasern benötigen im Experiment die stärksten Reizströme, um elektrisch erregt zu werden.

Experimentell ist ein elektrischer Reiz dann schmerzhaft, sobald er die dünnen A δ -Fasern reizen kann. Werden zusätzlich C-Fasern gereizt, wird der Schmerz als dumpf, brennend und länger anhaltend empfunden. Bei Reizwiederholung vermindert sich die Antwort der A δ -Fasern, die der C-Fasern wird immer stärker (Handwerker 1998).

Die C-Fasern sind in Gruppen angeordnet, den so genannten Remak-Bündeln. Ein Remak-Bündel ist von einer Schwannzelle umgeben, die für die Versorgung zuständig ist. Im Gegensatz dazu ist jede einzelne A δ -Faser von einer Myelinscheide umgeben. In den terminalen Regionen gibt es perlenartige Auftreibungen, die „freie Flächen“ darstellen, an denen das Axon nicht mehr von einer Myelinscheide umgeben ist, und das Axonlehm mit seiner Basalmembran direkt an die Umgebung angrenzt. Innerhalb dieser axonalen Auftreibung befindet sich die „Rezeptormatrix“, die aus Mitochondrien, Glykogengranula und Vesikel besteht und somit die physiologisch aktive Zone darstellt (Meßlinger 1997). Das Ende des Axons bildet mehrere sensorische Endbäumchen aus, was zu multiplen rezeptiven Feldern führt. Die Endigungen der Nozizeptoren können sich polymodal verhalten, das heißt Rezeptoren für unterschiedliche Reize, z. B. chemische und mechanische Reize besitzen (Meßlinger 1997).

Gegenstand der vorliegenden Experimente ist das Kniegelenk. Es besitzt Afferenzen aus der Gelenkkapsel, den Sehnen und den Bändern. Hierbei gibt es mechanisch niederschwellige Afferenzen (low threshold mechano-rezeptive, LTM), die auf passive (nicht-noxische) Bewegungen im Knie reagieren. Daneben gibt es Nervenendigungen im Kniegelenk, die im Wesentlichen zur Gruppe der A δ - und C-Fasern gehören, die von normalen Gelenkbewegungen nicht aktiviert werden. Sie reagieren nur auf unphysiologische Gelenkbewegungen und z. T. auf lokalen, schmerzhaften Druck auf die Gelenkkapsel (high threshold mechano-rezeptive,

HTM). Viele Nozizeptoren sind sowohl durch mechanische Reize als auch durch chemische Reize wie Bradykinin oder Prostaglandin aktivierbar. Es gibt zusätzlich eine Gruppe von Nozizeptoren, die weder auf normale Bewegung noch auf noxische Reize reagieren. Man nennt diese Gruppe „schlafende Nozizeptoren“, da sie erst durch Entzündung aktiviert werden können (Grigg et al. 1986, Schaible and Schmidt 1988).

Die Zellkörper der Nozizeptoren liegen in den Hinterwurzelganglien des Rückenmarks. Nozizeptoren sind afferente Neurone, sie haben jedoch auch eine efferente Funktion. Sie produzieren Neuropeptide, von denen die wichtigsten Substanz P, Neurokinin A und CGRP („calcitonin gene-related peptide“) sind, und setzen diese bei Erregung aus ihren peripheren und zentralen Endigungen frei (Kobayashi et al. 2005, Nakamura-Craig et al. 1991, Schaible and Grubb 1993). Neuropeptide können im Gewebe an prä- und/oder an postsynaptischen Rezeptoren wirken. Peripher sind sie an dem Phänomen der neurogenen Entzündung beteiligt und führen zu einer Vasodilatation an postkapillären Arteriolen (durch CGRP) bzw. zu einer Plasmaextravasation und damit zur Ödembildung (durch Substanz P und Neurokinin A). CGRP und Substanz P wirken vor allem sensibilisierend auf die sensorischen Endigungen (Nakamura-Craig et al. 1991).

Die nozizeptiven Afferenzen ziehen zum Rückenmark, wo ihre zentralen Endigungen auf nachfolgende Neurone verschaltet sind. Diese erste synaptische Übertragung, nach Eintritt der nozizeptiven Afferenzen in das ZNS, findet in den Hinterhörnern des Rückenmarks und in den kaudalen Trigeminskernen statt. Der experimentelle Zugang zu spinalen Neuronen ist schwierig, und beim Menschen verbietet sich ihre elektrophysiologische Untersuchung aus ethischen Gründen. Deshalb ist über die spinalen Mechanismen beim Menschen wenig bekannt.

Der Neuroanatom Rexed hat das Hinterhorn im Rückenmark in verschiedene Schichten I-X eingeteilt. Nozizeptiver Einstrom gelangt v. a. in die Laminae I, II und V. Zentrale Endigungen nichtnozizeptiver taktiler Afferenzen der Haut reichen hauptsächlich in Lamina III und IV. Nozizeptive Afferenzen aus der Viscera und dem Tiefengewebe (Gelenke, Muskeln) enden vor allem in Lamina I und im seitlichen Bereich des Hinterhorns, dem lateralen Kern und in der Lamina X, in der Nähe des

Zentralkanal (Craig et al. 1988, Mense 1997, Schaible und Grubb 1993). (siehe Abbildung 1.1)

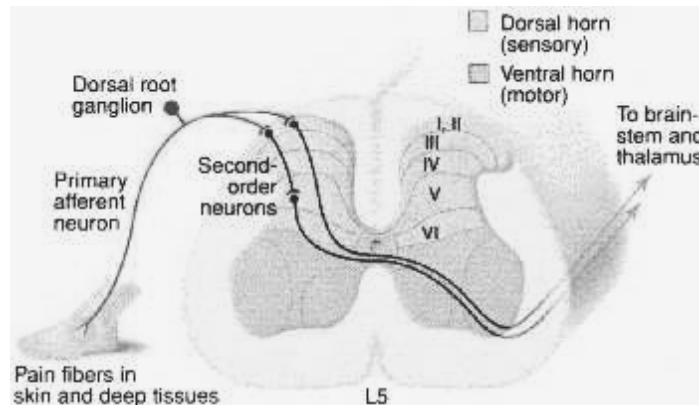


Abb. 1.1 Schmerzbahn. Querschnitt durch das Rückenmark in Höhe von L5 (Iadarola und Caudle, aus: Science 278 [1997], 239)

Im Rückenmark der Ratte sind die Neurone mit den Afferenzen vom Kniegelenk vor allem in den Laminae I, IV-VI, VII und VIII der Segmente L1-L4 lokalisiert. Es existieren verschiedene Arten von spinalen Neuronen. Zum einen gibt es die nozizeptorspezifischen Neurone (NS). Diese werden nicht durch niederschwellige taktile Reize aktiviert sondern nur durch schmerzhaft Reize. Zum anderen gibt es die „Wide-dynamic-range“ Neurone (WDR). Diese werden durch leichte Berührungen bis zu noxischen Reizen aktiviert, wobei noxische Reize höhere Entladungsfrequenzen hervorrufen als nicht noxische Reize. NS- und WDR-Neurone werden in allen Schichten des Hinterhorns gefunden (Schaible and Grubb 1993).

In allen Schichten sind auch Neurone enthalten, die keinen nozizeptiven Input erhalten, sondern nur taktilen. Die Axone eines Teils der Neurone gelangen im Vorderseitenstrang, als Tractus spinothalamicus, der in mediale und laterale Bahnen eingeteilt wird, zu dem ventrobasalen Komplex im Thalamus, wobei sie teilweise im Ursprungssegment des Rückenmarks auf die kontralaterale Seite kreuzen (siehe Abbildung 1.2). Diese aufsteigenden Bahnen aktivieren das thalamokortikale System, das in höheren Hirnzentren bewusste Schmerzwahrnehmung möglich macht. Ein schmerzhafter Reiz kann z. B. durch seine Lokalisation, Dauer und Intensität

charakterisiert werden. Diese Art von Informationen wird im lateralen thalamocortikalen System verarbeitet und von den lateralen Thalamuskernen auf die Gebiete SI und SII des Gyrus postcentralis übertragen. Eine zweite Komponente der Schmerzwahrnehmung ist die affektive, emotionale, wobei ein schmerzhafter Reiz z. B. Unwohlsein und Gegenwehr auslösen kann. Diese Komponente wird im medialen thalamocortikalen System verarbeitet und von den medialen Thalamuskernen auf den vorderen Gyrus cinguli, die Insula und den präfrontalen Kortex übertragen (Schaible and Richter 2004, Basbaum et al. 1999 und Treede et al. 1999).

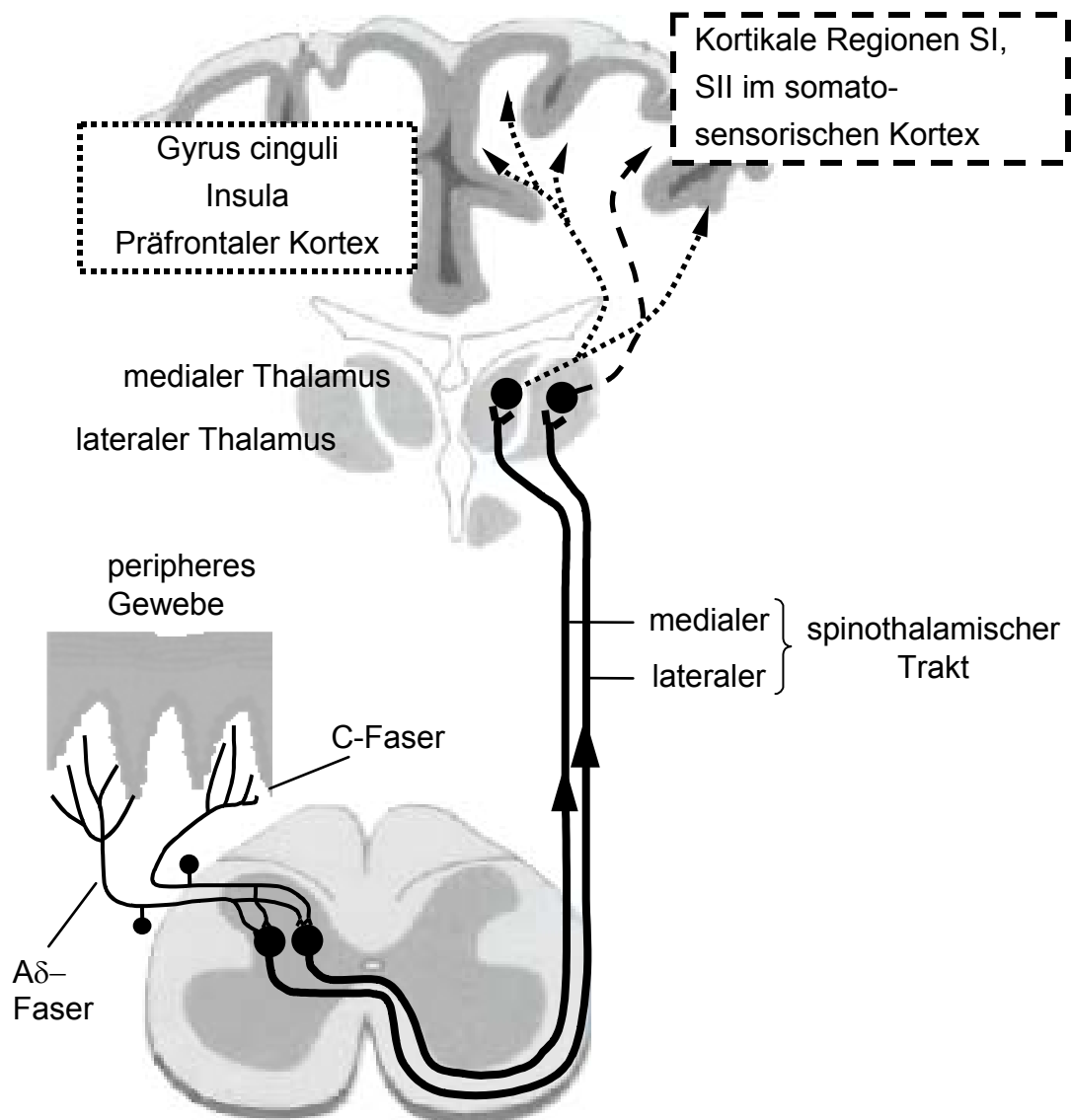


Abbildung 1.2: Schema des nozizeptiven Systems: mit nozizeptiven freien Endigungen im peripheren Gewebe, ihren afferenten Nervenfasern und ihren Synapsen im Hinterhorn des Rückenmarks. Von dort steigt der mediale und laterale Teil des Tractus spinothalamicus zu den medialen und lateralen Thalamuskernen auf (Schaible and Richter 2004).

1.3.1 Periphere Sensibilisierung

Entzündung ist ein Sammelbegriff für Abwehrreaktionen des Organismus gegen Schädigungen. Bei Erregung der sensorischen Endigungen oder unphysiologischer Reizung des Axons kann es zu einer Entzündungsreaktion kommen. Dabei gibt es verschiedene Ursachen. Sie können bakteriell oder autoimmunologisch wie bei der rheumatoiden Arthritis sein. Jede Entzündung hat auch eine neurogene Komponente, da erregte Nozizeptoren zusätzliche Entzündungsmediatoren aus ihren Endigungen freisetzen können. Entzündungsbedingte Schmerzen, vor allem der Gelenke, sind häufig klinisch relevante Schmerzen. Bei einer Entzündung werden primär afferente nozizeptive Fasern sensibilisiert (periphere Sensibilisierung), so dass sie bereits durch mechanische Reize niedriger Intensität aktiviert werden, die Nozizeptoren normalerweise nicht erregen und nicht zu Schmerz führen (Perl et al. 1976, Campbell und Meyer 1983, Schaible und Grubb 1993).

Die periphere Sensibilisierung führt zur primären Hyperalgesie, das bedeutet eine verstärkte Antwort auf noxische und nichtschmerzhaft Reize durch Reduzierung der Reizschwelle für die Nozizeption aus dem geschädigten Bereich (Hardy et al. 1950). Nichtnoxische Reize, wie leichte Gelenkauslenkungen, führen dann schon zu einer Reizung der Nozizeptoren, das heißt, die Schwelle wird abgesenkt. Da die Nozizeptoren auf diese Reize jetzt stärker reagieren, kommen an den zentralen Synapsen mehr Impulse an. Außerdem werden „schlafende Nozizeptoren“ aktiviert, so dass insgesamt mehr Neurone nozizeptiven Input weiterleiten, was zu einer „räumlichen Bahnung“ führt, das heißt, die Anzahl der aktivierten Synapsen nimmt zu (Handwerker 1995).

Typische Entzündungssymptome wie Rötung, Schwellung und Erwärmung kommen durch die Ausschüttung von Entzündungsmediatoren (Substanz P und CGRP) aus Nerven zustande. Substanz P führt zu Plasmaextravasation und damit zu einem Gelenkerguss und CGRP führt zu Vasodilatation. Aus dem umgebenden Gewebe werden weitere Mediatoren z. B. Histamin und Bradykinin freigesetzt. Neuronale und gewebsspezifische Prozesse beeinflussen sich gegenseitig. Das kann an Gelenken zu einem Circulus vitiosus führen (Meßlinger 1997).

1.3.2 Zentrale Sensibilisierung

1.3.2.1 Kennzeichen der zentralen Sensibilisierung

Durch die periphere Entzündung nimmt, mitbedingt durch die zeitliche und räumliche Bahnung an zentralen Synapsen, der nozizeptive Input zu, was wiederum eine zentrale Sensibilisierung auslösen kann. Diese wurde bisher vor allem an den Nervenzellen des Rückenmarks untersucht. Kennzeichen der zentralen Sensibilisierung sind die Absenkung der Erregungsschwelle der Rückenmarkszellen bei Reizung des entzündeten Gewebes und die Verstärkung der Antworten des Neurons bei überschwelliger Reizung des entzündeten Gewebes. Zusätzlich werden die Antworten durch Reizung von gesundem Gewebe, das an das entzündete Gewebe angrenzt oder von diesem entfernt ist, verstärkt. Außerdem vergrößert sich das rezeptive Feld (Woolf 1983, Willis 1994). Werden Reize aus einem Areal außerhalb des entzündeten Bereichs, die vorher nicht oder nur moderat schmerzhaft waren, als schmerzhafter wahrgenommen, spricht man von sekundärer Hyperalgesie. Im sensibilisierten Zustand kann die Rückenmarkszelle nicht nur vermehrt von dünn myelinisierten und unmyelinisierten Primärafferenzen aktiviert werden, sondern auch von dick myelinisierten Afferenzen (Woolf 1983, Willis 1994). Dies ist wahrscheinlich eine weitere, wichtige neuronale Grundlage dafür, dass unter pathophysiologischen Bedingungen bereits ein leichter Druckreiz, der nur dick myelinisierte Primärafferenzen erregt, Schmerzen auslösen kann, was Allodynie genannt wird. Häufig wird auch ein Ruheschmerz empfunden, denn als Folge der zentralen Sensibilisierung kann die Spontanaktivität der spinalen Neurone ansteigen oder induziert werden (Schaible und Schmidt 2000).

1.3.2.2 Die Bedeutung von NMDA und AMPA–Rezeptoren für die zentrale Sensibilisierung

Als exzitatorischer Transmitter an der erregenden Synapse im Rückenmark dient die Aminosäure Glutamat (Watkins und Evans 1981, Foster und Fagg 1984). Es gibt verschiedene Rezeptortypen für Glutamat. Die wichtigsten Rezeptoren sind unter normalen Bedingungen AMPA-Rezeptoren, benannt nach dem Liganden α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-propionsäure. Außerdem gibt es noch NMDA-Rezeptoren, benannt nach dem Liganden N-methyl-D-aspartat. Diese Rezeptoren

sind sehr wichtig für die synaptische Plastizität bei der zentralen Sensibilisierung (Dickenson 1990, Dickenson und Sullivan 1990, Woolf und Thompson 1991, Bennett 2000). Die NMDA-Kanäle sind bei Membranpotentialen nahe dem Ruhepotential durch ein Magnesiumion blockiert (Nowak et al. 1984). Wenn Glutamat an den NMDA-Rezeptoren bindet, öffnen sich ihre Kanäle zunächst nicht. Das Neuron muss erst durch andere synaptische Prozesse depolarisiert werden, z. B. über die Aktivierung der AMPA-Kanäle, damit der Magnesiumblock gelöst wird (Nowak et al. 1984). Auch aus C-Fasern freigesetzte Neuropeptide wie Substanz P, Neurokinin A und CGRP können eine langandauernde Depolarisation bewirken. Die Aktivierung von NMDA-Rezeptoren hat einen Einstrom von Calciumionen in die Zelle zur Folge (McDermott et al. 1986, Ascher und Nowak 1988). Dieser kann Sekundärwirkungen auslösen, wie z. B. die Freisetzung von NO oder die Induktion der Cyclooxygenasen (COX), Enzyme, welche die Herstellung von Prostaglandinen aus Arachidonsäure ermöglichen (Handwerker 1998). Siehe dazu Abbildung 1.3 und 1.4.

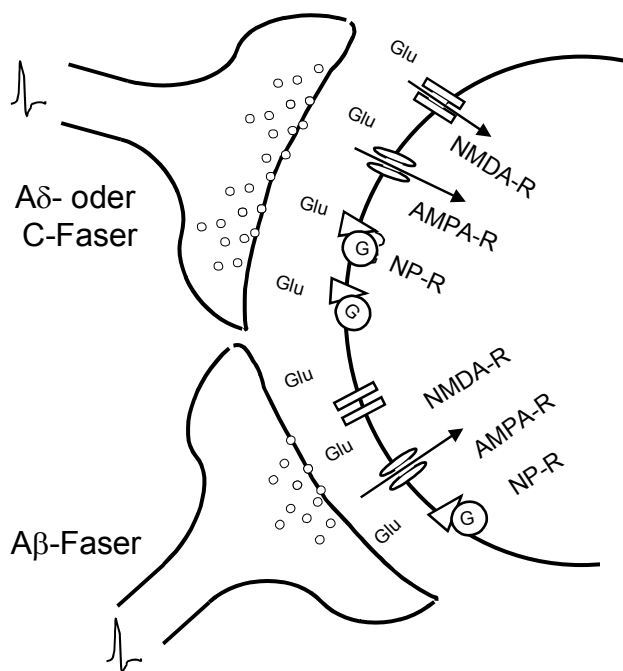


Abb. 1.3: Modell der synaptischen Übertragung von sensorischen Afferenzen aus der Peripherie auf nozizeptive Neurone im Hinterhorn des Rückenmarks unter normalen Bedingungen: Reize in der Peripherie führen zu einer Erregung von Aβ-Fasern, Aδ- und C-Fasern, die dadurch an ihren zentralen Endigungen Glutamat freisetzen. Bei Aktivierung von

A β -Fasern werden nur AMPA-Rezeptoren (AMPA-R) erregt. Bei Aktivierung von A δ - und C-Fasern können sowohl AMPA- als auch NMDA-Rezeptoren aktiviert werden.

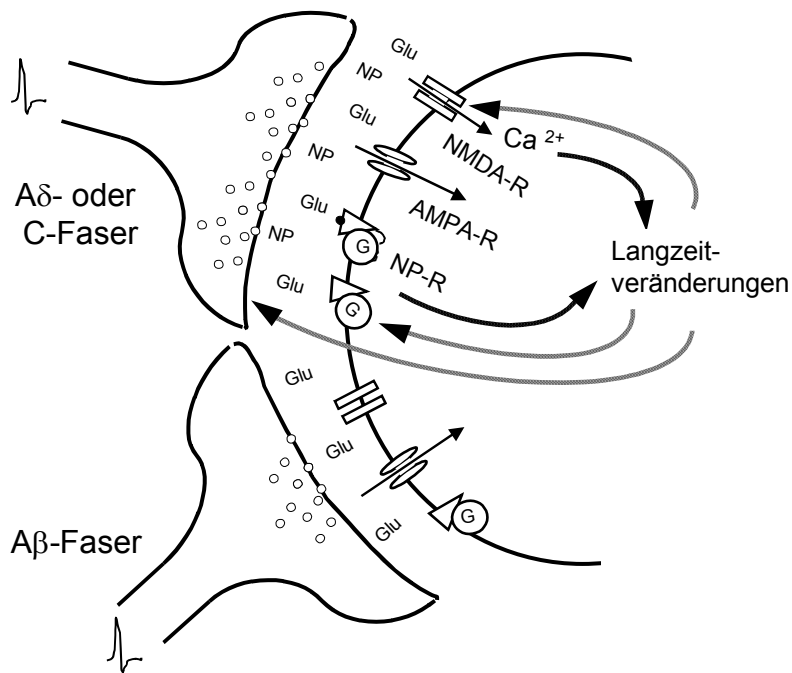


Abb. 1.4: Modell der synaptischen Übertragung zwischen sensorischen Afferenzen aus der Peripherie auf nozizeptive Neurone im Hinterhorn des Rückenmarks unter entzündeten Bedingungen: Durch die periphere Entzündung werden aus den zentralen Endigungen der nozizeptiven Afferenzen Glutamat und Neuropeptide freigesetzt. Postsynaptisch werden neben AMPA-Rezeptoren (AMPA-R) und Neuropeptidrezeptoren (NP-R) auch NMDA-Rezeptoren (NMDA-R) aktiviert. Der Ca²⁺-Einstrom über die NMDA-R kann zu Langzeitveränderungen führen.

Die wiederholte Reizung von C-Fasern löst exzitatorische postsynaptische Potentiale von langer Dauer aus. Im Hinterhorn können lang anhaltende Depolarisationen eine starke postsynaptische Antwort der WDR-Neurone hervorrufen. Die damit verbundene, erhöhte intrazelluläre Kalziumkonzentration triggert lang anhaltende Prozesse, die mit neuronaler Plastizität in Verbindung gebracht werden (Schaible und Schmidt 2000).

Ein Schlüsselmechanismus für die Entstehung und Aufrechterhaltung der entzündungsbedingten Übererregbarkeit ist die Aktivierung von NMDA-Rezeptoren. In wachen Tieren löst die intrathekale Applikation von NMDA schmerztypische Verhaltensweisen aus (Aanonsen und Wilcox 1986). In Verhaltensexperimenten

wurde die Beteiligung von NMDA-Rezeptoren an der Entstehung von Hyperalgesie, in mehreren Schmerzmodellen gezeigt. Die Entstehung und Aufrechterhaltung von thermischer Hyperalgesie, die bei einer Reihe von experimentell hervorgerufenen Mononeuropathien beobachtet wurde, konnte durch Vorbehandlung mit NMDA-Antagonisten, die intraperitoneal oder intrathekal vor und einige Tage nach der Nervenläsion appliziert wurden, verhindert oder abgeschwächt werden (Davar et al. 1991, Mao et al. 1992a, b, Seltzer et al. 1991). Die intrathekale Applikation von NMDA-Antagonisten verhinderte die verstärkten nozizeptiven Antworten im Formalin Test (Coderre und Melzack 1992). NMDA-Antagonisten unterdrückten in nozizeptiven Neuronen das „wind-up“, den Anstieg der Antworten auf die Aktivierung von C-Fasern, bei wiederholter Stimulation (Davies and Lodge 1987, Dickenson and Sullivan 1990, Thompson et al. 1990). NMDA-Antagonisten reduzierten die Spontanaktivität und die mechanisch ausgelöste Aktivität der Rückenmarkneurone bei Entzündung (Ren et al. 1992, Schaible et al. 1991a) und Ischämie (Sher und Mitchell 1990b). Die Applikation von NMDA-Antagonisten blockierte den Anstieg der Reflexantworten von Motoneuronen auf die Applikation von Senföl (Woolf und Thompson 1991) und die Übererregbarkeit in spinothalamischen Neuronen, ausgelöst durch Injektionen von Capsaicin in die Haut (Dougherty et al. 1992a). Zusammenfassend kann man folgern, dass der NMDA-Rezeptor relevant für die Entstehung spinaler Übererregbarkeit ist.

In elektrophysiologischen Experimenten reduzierte der NMDA-Antagonist unter normalen Bedingungen nur die Antworten auf schmerzhafte Reize. Bei Tieren mit entzündetem Knie reduzierte er sowohl die Antworten auf schmerzhafte Reize wie auch auf nichtschmerzhafte Reize (Neugebauer et al. 1993a). Dies zeigt, dass sich die Rolle der NMDA-Rezeptoren während der Entzündung verändert. Ob dies ein Ergebnis erhöhter Glutamatkonzentrationen, gesteigerter Rezeptorempfindlichkeit und/oder einer erhöhten Rezeptorzahl ist, bleibt im Einzelfall zu klären.

1.4 Prostaglandine

Prostaglandine gehören zu der Gruppe der Eicosanoide, die insbesondere an entzündlichen Reaktionen beteiligt sind. Eicosanoide werden nicht vesikulär

gespeichert, sondern bei Bedarf aus ihrer Vorstufe, der Arachidonsäure (all-cis-5, 8, 11, 14-Eicosatetraensäure), hergestellt. Diese ist zum größten Teil in die Phospholipide der Zellmembran eingebaut. Die Arachidonsäure wird durch die Aktivierung von Phospholipase A₂ und Phospholipase C (Vanegas und Schaible 2001) freigesetzt und anschließend entweder zu Prostaglandinen oder zu Leukotrienen oxidiert (siehe Abbildung 1.5).

Der Name Prostaglandin beruht darauf, dass diese Substanzen zunächst im Sekret der Prostata gefunden wurden. Sie kommen aber nicht nur dort vor, sondern in allen Organen, wo sie vielfältige Aufgaben haben. Die Entstehung von Prostaglandin aus der Arachidonsäure wird von der Cyclooxygenase katalysiert. Man hat zwei unterschiedliche Isoformen der Cyclooxygenase entdeckt (COX-1 und COX-2), die auch unterschiedliche Funktionen haben. Die COX-1 ist konstitutiv vorhanden und ist für die fortwährende Produktion von Prostaglandinen verantwortlich wie z. B. im Magen, Ovarien, Thrombozyten und in der Niere, wo Prostaglandin wichtige physiologische Aufgaben hat. Prostaglandin ist dort für die Verringerung der Magensaftsekretion und die erhöhte renale Natriumionenausscheidung zuständig. Die COX-2 wird einerseits konstitutiv exprimiert z. B. im Rückenmark, in der Niere und im Uterus, andererseits wird durch entzündliche Prozesse eine gesteigerte Expression der COX-2 induziert (Vane et al. 1998).

Primär afferente Fasern und Zellen des Rückenmarks können Prostaglandine produzieren. Man hat festgestellt, dass bei einer peripheren Entzündung die COX-2 mRNA (Beiche et al. 1996, Hay et al. 1997) und die Menge an COX-2 Protein im Rückenmark ansteigt (Ebersberger et al. 1999) und somit auch die Produktion von Prostaglandinen. Die Ausschüttung von Prostaglandinen im Rückenmark kann weiterhin durch akute schmerzhafte Stimulation, bestimmte exogene Agonisten wie NMDA, AMPA, Substanz P oder durch mechanische Verletzungen des Rückenmarks ausgelöst werden (Vanegas und Schaible 2001).

Der Grundbaustein der Prostaglandine ist die Prostansäure, eine C₂₀-Säure mit einem Cyclopentanring (siehe Abbildung 1.5). Die verschiedenen Prostaglandine unterscheiden sich durch die Zahl und die Stellung der Sauerstoffatome bzw. durch die Lage ihrer Doppelbindung am Cyclopentanring (Mutschler 2001). Im Rückenmark

werden vor allem PGD₂, PGE₂, PGF_{2α} und PGI₂ synthetisiert (Vanegas und Schaible 2001). Diese Arbeit konzentriert sich auf PGE₂. Die verschiedenen Prostaglandine binden an G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, die DP- und EP₂-Rezeptoren in postsynaptischen Neuronen der Hinter- und Vorderhörner und EP₁-, EP₃-, EP₄- und IP-Rezeptoren in primär afferenten Neuronen (Vanegas und Schaible 2001). Durch die Bindung von Prostaglandinen wird eine intrazelluläre Signalkaskade aktiviert, die die Konzentrationen von Kalzium und/oder cAMP verändert. Wobei unter normalen Bedingungen die Aktivierung des EP₁-Rezeptors zu einem Einstrom von Kalzium und damit zu einer Erhöhung von Inositoltriphosphat (IP₃) führt. Die Aktivierung von EP₂-, EP₄- und bestimmten Isoformen von EP₃-Rezeptoren führt dagegen zu einer Erhöhung der cAMP-Konzentration (Colemann et al. 1994, Narumiya et al. 1999).

Unter entzündlichen Bedingungen verändert sich mit Ausnahme des EP₁-Rezeptors die Bedeutung der Rezeptoren. Die Aktivierung von EP₂- und EP₄-Rezeptoren führt nicht mehr zu einer Steigerung der Antworten der Neurone auf mechanische Reizung des Kniegelenks. Eine spinale Gabe eines EP_{3α}-Agonisten verringert dagegen die neuronalen Antworten auf mechanische Reizung, was vermutlich auf eine Reduktion der cAMP-Konzentration zurückzuführen ist (Bär et al. 2004).

Zu den direkten Effekten von Prostaglandinen gehört außerdem die Induktion der Freisetzung von Substanz P, CGRP, Glutamat und Aspartat im Rückenmark, was auf einen präsynaptischen Angriffspunkt der Prostaglandine hinweisen könnte. Aber auch postsynaptische Effekte, z. B. auf die Aktivierung der NMDA-Rezeptoren könnten vorhanden sein (Andreeva and Rang 1993, Hingtgen et al. 1995, Nicol et al. 1992, Southall et al. 1998, Vasko et al. 1994, Vasko 1995).

NSAIDs (Nichtsteroidale Antiphlogistika), wie Acetylsalicylsäure, Indomethacin oder Ibuprofen gehören zu den am längsten bekannten Analgetika, doch ihr Wirkungsmechanismus ist immer noch nicht vollständig geklärt. Man weiß aber, dass sie die Cyclooxygenasen (COX-1 und COX-2) hemmen und so die Produktion von Prostaglandinen aus der Arachidonsäure blockieren. Die hohe Effektivität von NSAIDs als Schmerzmittel weist darauf hin, dass Prostaglandine eine wichtige Rolle in der Schmerzentstehung spielen müssen. Direkte Applikation von Prostaglandinen

auf das Rückenmark löst z. B. Hyperalgesie und Allodynie aus (Uda et al. 1990, Minami et al. 1994).

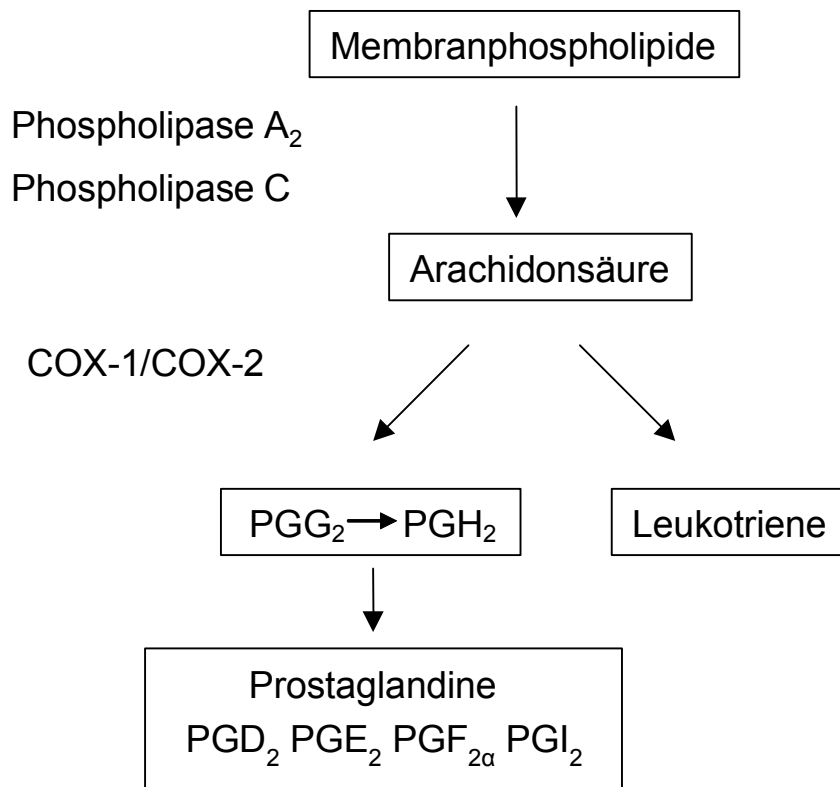


Abbildung 1.4: Schritte der Prostaglandinsynthese. Aus Membranphospholipiden wird durch Phospholipase A₂ und Phospholipase C Arachidonsäure freigesetzt. COX-1 und COX-2 sind an der Synthese von Prostaglandinen und Leukotrienen beteiligt.

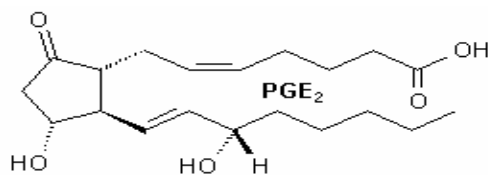


Abbildung 1.5 : Strukturformel von PGE₂ (Biele und Fels 2003).

1.5 Fragestellung: Welche Beteiligung haben Prostaglandine am entzündungsbedingten Schmerz?

Spinal applizierte Prostaglandine führen zu einer Übererregbarkeit von nozizeptiven Rückenmarkneuronen auf mechanische Reize. Eine vergleichbare Übererregbarkeit der Neurone entsteht auch nach peripherer Entzündung des Kniegelenks (Vasquez et al. 2001), und diese ist signifikant abgeschwächt, wenn Indomethacin vor Induktion der Entzündung auf das Rückenmark appliziert wird. NMDA- und AMPA-Rezeptoren sind die Bindungsstellen für Glutamat, den wichtigsten exzitatorischen Transmitter im Rückenmark und haben fundamentale Bedeutung im nozizeptiven System (Handwerker 1998). Diese beiden Tatsachen führten zu der Frage, ob die Entstehung der Übererregbarkeit durch Prostaglandin E_2 durch einen Einfluss des Prostaglandins auf die Aktivierung von NMDA- und AMPA-Kanälen rückführbar ist.

Nachdem auch für die Aufrechterhaltung der zentralen Sensibilisierung NMDA-Kanäle unter Entzündungsbedingungen erforderlich sind, sollten die Versuche sowohl an Tieren mit normalem als auch mit akut entzündetem Kniegelenk durchgeführt werden. Es wurde daher geprüft, ob die topische Applikation von PGE_2 auf das Rückenmark die Antworten der Hinterhornneurone, die bei Reizungen von Kniegelenkafferenzen aktiviert werden, auf die microiontophoretische Applikation von AMPA und NMDA auf die abgeleitete Zelle beeinflusst.

Zu diesen Experimenten wurde PGE_2 exogen zugeführt. Um Bedingungen zu wählen, die dem Geschehen bei Entzündung näher kommen, wurde auch die Bedeutung endogener Prostaglandine untersucht. Bei Tieren mit entzündetem Kniegelenk wurde daher untersucht, ob auf das Rückenmark applizierte Indomethacin die Antworten der Neurone auf NMDA und AMPA beeinflusst.

Kapitel 2: Methode und Material

2.1 Herstellung der Elektrode

Für die Experimente war es notwendig eine Methode zu verwenden, die die Transmitterübertragung an den Synapsen im Rückenmark imitieren kann. Deshalb wurde die Methode der Microiontophorese (griech. Hervorrufen von Bewegung) gewählt, die von Curtis und Eccles 1958 für Arbeiten am zentralen Nervensystem entwickelt wurde. Um das Rückenmark so wenig wie möglich zu traumatisieren, wurden Mikropipetten mit einem Gesamtspitzendurchmesser von 5 μm verwendet. Um möglichst nur die zu untersuchenden Zellen zu aktivieren, war es außerdem notwendig, nur äußerst geringe Mengen zu bestimmten Zeiten applizieren zu können. In der Microiontophorese wurde dies erreicht, indem geladene Moleküle durch Spannungsdifferenzen, zwischen dem Inneren der Mikropipette und der Umgebung, durch Anlegen eines Stroms nach außen getrieben wurden oder in der Mikropipette gehalten wurden. So wurde durch die Wahl des Ejektionsstroms eine gewünschte Menge an Substanz appliziert.

Wenn die Substanz nicht appliziert werden sollte, wurden die geladenen Moleküle durch Anlegen eines Haltestroms an der Diffusion aus der Pipette gehindert. Wie in Abbildung 2.1 sichtbar, wurde eine Mikropipette mit einer gewünschten Substanz gefüllt und mit dem Iontophoresegerät, hier als Stromquelle dargestellt, verbunden. Für das Ende, das im Kontakt mit der Lösung stand, wurde ein Platindraht verwendet, da dieser, je nach gewünschter Stromrichtung, einen Plus- oder Minuspol darstellen konnte. Es wurden durch Spannungsunterschiede geladene Moleküle in die gewünschte Richtung bewegt, abhängig von ihrer jeweiligen Ladung. In Abbildung 2.2 sieht man, dass durch die doppelte Grenzschicht, Glas/Wasser, die negativen Ladungen von der Glasoberfläche absorbiert wurden, und somit die Lösung eine positive Ladung erhielt. Jetzt wurde bei angelegtem Strom eine gewisse Menge der Ionen appliziert und mit ihr auch ungeladene Moleküle (solvent drag).

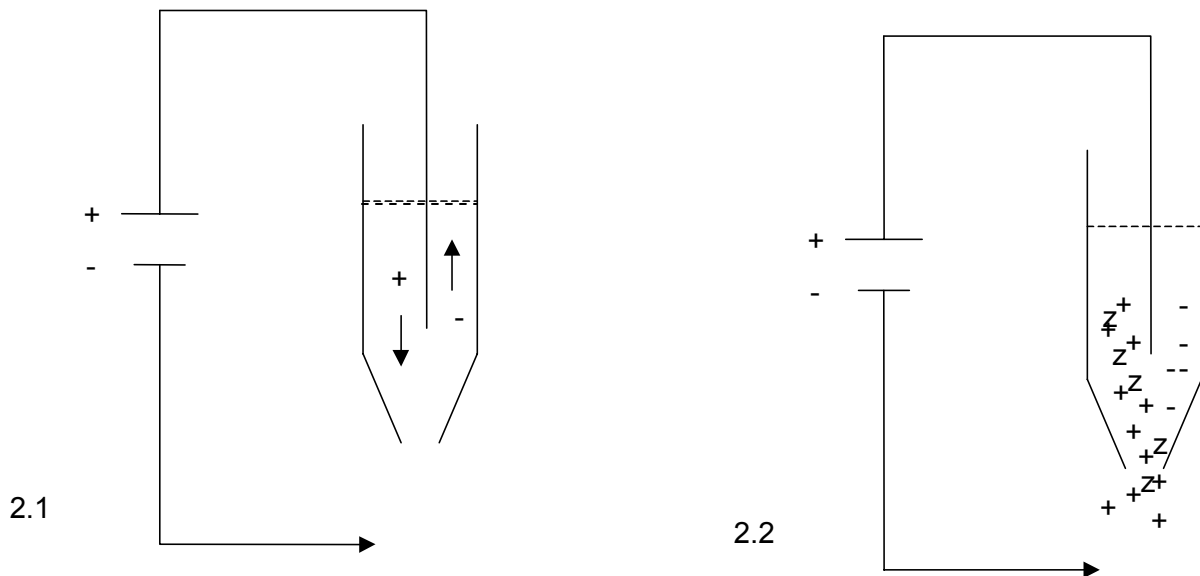


Abbildung 2.1: Iontophorese: Ionenbewegung durch Ladungsunterschiede zwischen der Innenseite und der Außenseite der Mikropipette.

Abbildung 2.2: Elektro-Osmose: durch doppelte Grenzschicht, Glas/Wasser, ist die Lösung mehr positiv geladen, da die negativen Ladungen von der Glasoberfläche absorbiert werden. Ungeladene Verbindungen (z) werden mit der Lösung ausgeschwemmt (solvent drag).

Es wurde außerdem eine Mikropipette mit NaCl gefüllt, als Kontrolle, um den Effekt des Applikationsstroms selbst auf die Zelle zu testen. Der Gesamtstrom (Summe aus Applikationsstrom und Halteströmen) wurde durch die Applikation von NaCl auf null gehalten. Zusätzlich hatte das Gerät eine Balanceeinheit mit einer eigenen Elektrode, die diesen Vorgang noch mal automatisch reguliert.

2.1.1 Herstellung der Carbonfaserelektrode

Der eine Teil der Iontophoreseelektrode bestand aus einer glasisolierten Carbonfaserelektrode. Diese wurde für die extrazelluläre Ableitung der Neurone eingesetzt. Zuerst wurde die Carbonfaser durch einen Silberleitlack mit einem Silberdraht verbunden, an dessen Ende ein Goldstecker befestigt war. Zur Isolierung der Carbonfaser wurde eine Glaskapillare (Borosilikatglas, Typ 1103244, Hilgenberg, Malsfeld) bis zum Stecker über das Filament geschoben und am Goldstecker mit

einem Zweikomponentenkleber angebracht. Mit dem Elektrodenziehgerät (Nachbau: Narashige, Tokyo) wurde die Glaskapillare zu einer Elektrode mit einem Spitzendurchmesser von ca. 5 μm gezogen. Dazu wurde das Glas geschmolzen und mit Hilfe eines Elektromagneten getrennt. Um einen optimalen Widerstand von 5-10 $\text{M}\Omega$ zu erreichen, wurde das überstehende Ende der Carbonfaser auf eine bestimmte Länge durch Oxidation gekürzt. Dazu wurde ein Glasröhrchen mit einer 0,1 M H_2SO_4 – Lösung, angereichert mit $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, so gefüllt, dass ein konvexer Meniskus über das Röhrchen ragte. Unter mikroskopischer Sicht (Carl Zeiss) wurde nun das Ende der Carbonfaser bei einer anliegenden Spannung von 25-35 Volt an den Tropfen herangeführt, um so die Carbonfaser abzuätzen.

2.1.2 Herstellung der Mehrfachelektrode

Zur Herstellung der eigentlichen Iontophoreseelektrode wurde ein Elektrodenglas genommen, das aus fünf Einzelkapillaren bestand (Borosilikatglaskapillaren mit Filament Typ 1405307 Hilgenberg, Malsfeld), die mit unterschiedlichen Substanzen befüllt werden konnten. Zur Bearbeitung wurde das Elektrodenglas in einem vertikalen Elektrodenziehgerät (Nachbau: Narashige, Tokyo) befestigt. Hier wurde es in zwei Schritten spitz ausgezogen. In der ersten Stufe wurde das Glas geschmolzen und 180° um die Längsachse gedreht, um die einzelnen Kapillaren miteinander zu verbinden und mit Hilfe eines Elektromagneten (Heizung: 65, Magnet: 30) um ca. 1-1,5 cm auseinander gezogen. Im zweiten Schritt wurde das Elektrodenglas vollständig in zwei Teile mit spitzen Enden getrennt. Der Spitzendurchmesser betrug dabei ca. 3-5 μm .

Um später die Spitze der Glaskapillare mit einer Carbonfaser zu verbinden, wurde diese mit Hilfe eines glühenden Platin-Iridium-Drahtes gebogen. Unter optischer Kontrolle wurde der Draht so dicht wie möglich an das senkrecht eingespannte Glas gebracht, ohne dieses jedoch zu berühren. Der Heizdraht sollte ungefähr 0,3 cm oberhalb der Spitze sein, je nach Dicke der Spitze. Um die Spitze zu biegen, brachte man den Draht durch eine Spannung von 5 Volt und einem Strom von ca. 5 Ampere zum Glühen. Durch die Hitze bog sich die Spitze in Richtung Glühdraht. Wenn ein Winkel von ca. $40-45^\circ$ erreicht wurde, wurde der Glühdraht schnell entfernt, um die Glasspitze nicht zu beschädigen.

2.1.3 Applikationslösungen

Die fünf Röhrchen der Mehrfachelektrode wurden mit folgenden Lösungen gefüllt:

1. **(R,S)-alpha-Amino-3-hydroxy-5-methylisoxazol-4-propionsäure** (AMPA, 10 mM in 200 mM NaCl, pH 7,4 - 7,6; RBI, Deisenhofen),
2. **N-methyl-D-aspartat** (NMDA, 50 ml in 150 mM NaCl, pH 7,5 - 7,8; Sigma, Deisenhofen),
3. **NaCl 165 mM** (pH 7,4 - 7,5),
4. **NaCl 1 M** (pH 7,4 - 7,5).

Mit Lösung 3 wurden zwei Kapillaren gefüllt. Nach dem Füllen wurde unter dem Mikroskop überprüft, ob Luftblasen in den Lösungen vorhanden waren, die den Stromfluss verhindern würden. Wenn noch Blasen sichtbar waren, versuchte man mit Hilfe eines Glühdrahts, der mit einer Spannung von maximal 2 Ampere erhitzt wurde, die Blasen durch Wärme an die Oberfläche der Lösungen steigen zu lassen.

Nachdem alle Blasen entfernt waren, wurde unter dem Mikroskop, durch eine leichte Berührung mit einem abgerundeten Glasstab, die Spitze der Elektrode abgebrochen, um eine etwas größere Öffnung zu erzeugen.

2.1.4 Verbinden von Carbonfaser- und Mehrfachelektrode

Da Ableitung und Applikation an der gleichen Stelle erfolgen sollten, wurde die glasisolierte Carbonfaser mit dem gefüllten Mehrfachglas an den spitzen Enden miteinander verbunden. Mit einem Mikromanipulator wurden die beiden Spitzen in die gleichen räumlichen Ebenen gebracht, um sie schließlich direkt aneinander zu legen und zu fixieren. Dabei wurde unter der Sicht von zwei Mikroskopen beachtet, dass eine möglichst große Berührungsfläche erreicht wurde und sicher war, dass bei der Berührung die Gläser nicht unter Spannung standen. Nun wurden die Spitzen mit einem lichthärtenden Klebstoff (Helibond; Vivadent, Schaam, Liechtenstein) verbunden und mit Hart-Klebewachs zusätzlich fixiert (siehe Abbildung 2.3).

Um später die Iontophoreseelektrode mit dem Iontophoresegerät zu verbinden, um Ionenströme auslösen zu können, wurde in jedes Röhrchen ein Platindraht eingeführt, an dessen oberem Ende ein Goldstecker angebracht war. Danach wurden die Drähte mit Wachs befestigt, damit sie sich nicht berühren konnten und fixiert waren.

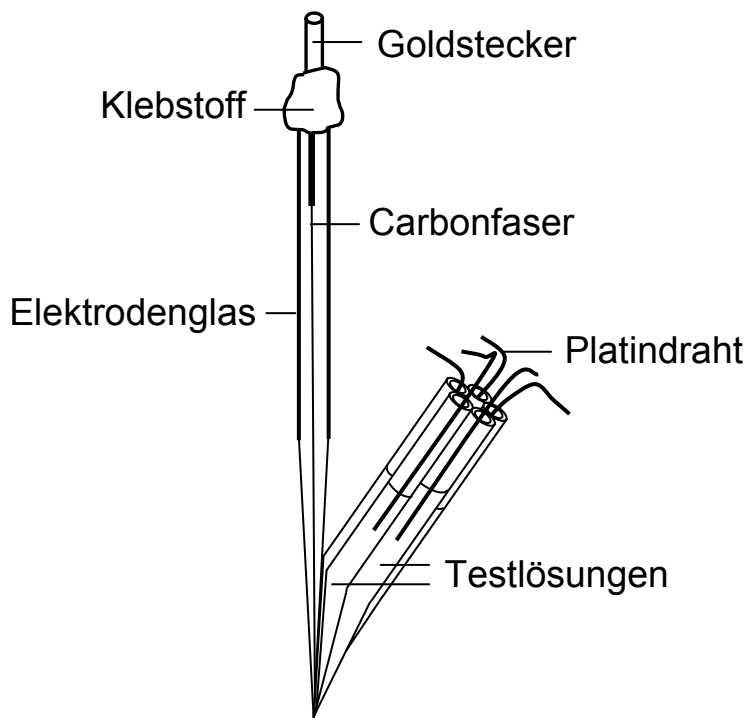


Abbildung 2.3: Eine Carbonfaserelektrode (links), die mit der Mikroiontophoreselektrode (rechts) an der Spitze verbunden wurde.

2.2 Präparation der Versuchstiere

2.2.1 Narkose und Überwachung der Vitalparameter

Zu den Experimenten wurden 41 männliche Wistar Ratten (200-350 g, Universität Jena) verwendet, die während der Versuchszeit mit Thiopental (Trapanal®, Byk Gulden, Konstanz) narkotisiert waren. Eingeleitet wurde die Narkose durch eine initiale Dosis von 85-115 mg/kg Thiopental i. p. Die Tiere atmeten spontan. Um die Atmung zu erleichtern, wurden die Tiere tracheotomiert und eine Trachealkanüle eingeführt. An diese wurde ein Gemisch aus Raumluft und Sauerstoff herangeleitet.

Katheter wurden sowohl in die Arteria carotis communis als auch in die Vena jugularis externa eingeführt. Durch den Arterienkatheter wurde ständig der mittlere Blutdruck gemessen. Dieser lag zwischen 90-120 mmHg. Steigende Blutdruckwerte nach noxischer Reizung waren ein Hinweis darauf, dass die Narkosewirkung nachließ. In solchen Fällen wurde ca. 20 mg/kg Thiopental intraperitoneal gegeben, um wieder die nötige Narkosetiefe zu erlangen. Diese war erreicht, wenn weder Korneal- noch Wegziehreflexe auslösbar waren. Die Körpertemperatur wurde rektal gemessen und über ein Rückkopplungs-System, das an eine Heizdecke angeschlossen war, konstant auf 37 °C gehalten.

2.2.2 Laminektomie und Fixierung der Versuchstiere

Das Rückenmark wurde durch eine Laminektomie auf der Höhe von L₁-L₄ von dorsal freigelegt. Dazu wurde nach einem Hautschnitt die paravertebrale Muskulatur entfernt, und das Versuchstier wurde mit dem Kopf in einen stereotaktischen Rahmen gespannt. Um die Wirbelsäule zu fixieren und vor Erschütterungen zu schützen, wurden an den vier Wirbeln auf beiden Seiten Schwanenhalsklemmen unter die Processi transversi geschoben und am Rahmen des Aufbaus befestigt. Unter mikroskopischer Sicht wurde nun vorsichtig mit Hilfe einer Knochenzange die dorsale Seite des Rückenmarks freipräpariert, und die Hautlappen um die Wirbelsäule wurden seitlich am Rahmen mit vier Fäden an jeder Ecke befestigt.

2.2.3 Einbringen der Ratte in den Versuchsaufbau

Um bei der späteren Ableitung Störungen zu vermeiden, wurde das Versuchstier mit dem stereotaktischen Rahmen auf einen schwingungsgedämpften Tisch, der durch pneumatische Steuerung Vibrationen abfangen konnte, befestigt. Das Rückenmark wurde mit Tyrode abgespült. Als nächstes wurde die Dura mit einer Vanna-Schere unter mikroskopischer Sicht eröffnet. An der Stelle, an der später die Ableitung stattfinden sollte, wurde ein dünnwandiger, ovaler Gummiring (ca. 3 x 5 mm) mit Silikongel auf das Rückenmark aufgesetzt. So entstand ein kleiner Trog mit einer Kapazität von ca. 30 µl. Um das Rückenmark vor dem Austrocknen zu schützen, wurde der Pool sofort mit Tyrode gefüllt, und die restliche Oberfläche des

Rückenmarks mit Agar (3 % in Tyrode; Fluka, Deisenhofen) bedeckt. Der Agar verhindert den Abfluss von Flüssigkeit aus dem Trog und stabilisiert zusätzlich das Rückenmark gegenüber Schwingungen.

2.2.4 Induktion einer Kniegelenkentzündung

Bei 23 Versuchstieren wurde ca. 5-10 Stunden (im Durchschnitt 7 Stunden) vor dem Beginn der Ableitung in beiden Kniegelenken eine Entzündung induziert. Dazu wurde eine 27-gauge Nadel benutzt, die durch das Ligamentum patellare geführt wurde, und es wurde langsam 70 µl einer 4%igen Kaolinlösung (Sigma, Deisenhofen) in die Gelenkhöhle injiziert. Nun wurde das Kniegelenk 15 Minuten lang bewegt, durch langsames Strecken und Beugen. Danach wurden 70 µl einer 2%igen Carrageenanlösung (Sigma, Deisenhofen) injiziert, und das Knie für weitere 5 Minuten bewegt. Das Gelenk wurde in den folgenden Stunden warm gehalten.

2.3 Versuchsaufbau

Auf Abbildung 2.4. sieht man den Versuchsaufbau schematisch dargestellt. Von der Carbonfaserelektrode werden die Aktionspotentiale von den Rückenmarkneuronen der Ratte abgeleitet. Dieses Signal wird durch verschiedenen Verstärker und Filter weiter geleitet in die Datenverarbeitung. Dort wird es zum einen akustisch und graphisch dargestellt und zum anderen zur weiteren Verarbeitung durch verschiedene Softwareprogramme abgespeichert. Außerdem ist noch eine Ionophoreseeinheit vorhanden durch die über die Microiontophoreseelektrode Substanzen direkt an das abgeleitete Neuron appliziert werden können. Die Einzelheiten werden im Folgenden erklärt.

2.3.1 Ionophorese

Die Ionophoreseeinheit ist einerseits mit der Elektrode und andererseits mit der „schwebenden Erde“ verbunden. Mit Hilfe dieser Einheit konnte man exakte Mengen von AMPA und NMDA applizieren. AMPA und NMDA, die als Anionen vorlagen, konnten durch positive Halteströme von 25 nA nicht unkontrolliert aus der Elektrode fließen. Um die Substanz zu applizieren, wurden die Ströme umgepolt. Die

Balanceeinheit steuerte automatisch den Ausstrom von Ionen mit entgegengesetzter Ladung aus dem mit 1 M NaCl gefüllten Elektrodenglas, damit die Summe der Ströme insgesamt 0 blieb, und so bei der Ableitung keine Artefakte entstanden. Zusätzlich wurde noch über eine mit NaCl 165 mM gefüllte Kontrolleinheit manuell ein Stromausgleich eingestellt. Die „schwebende Erde“ verhinderte, dass Störströme die Applikationsströme beeinflussen konnten.

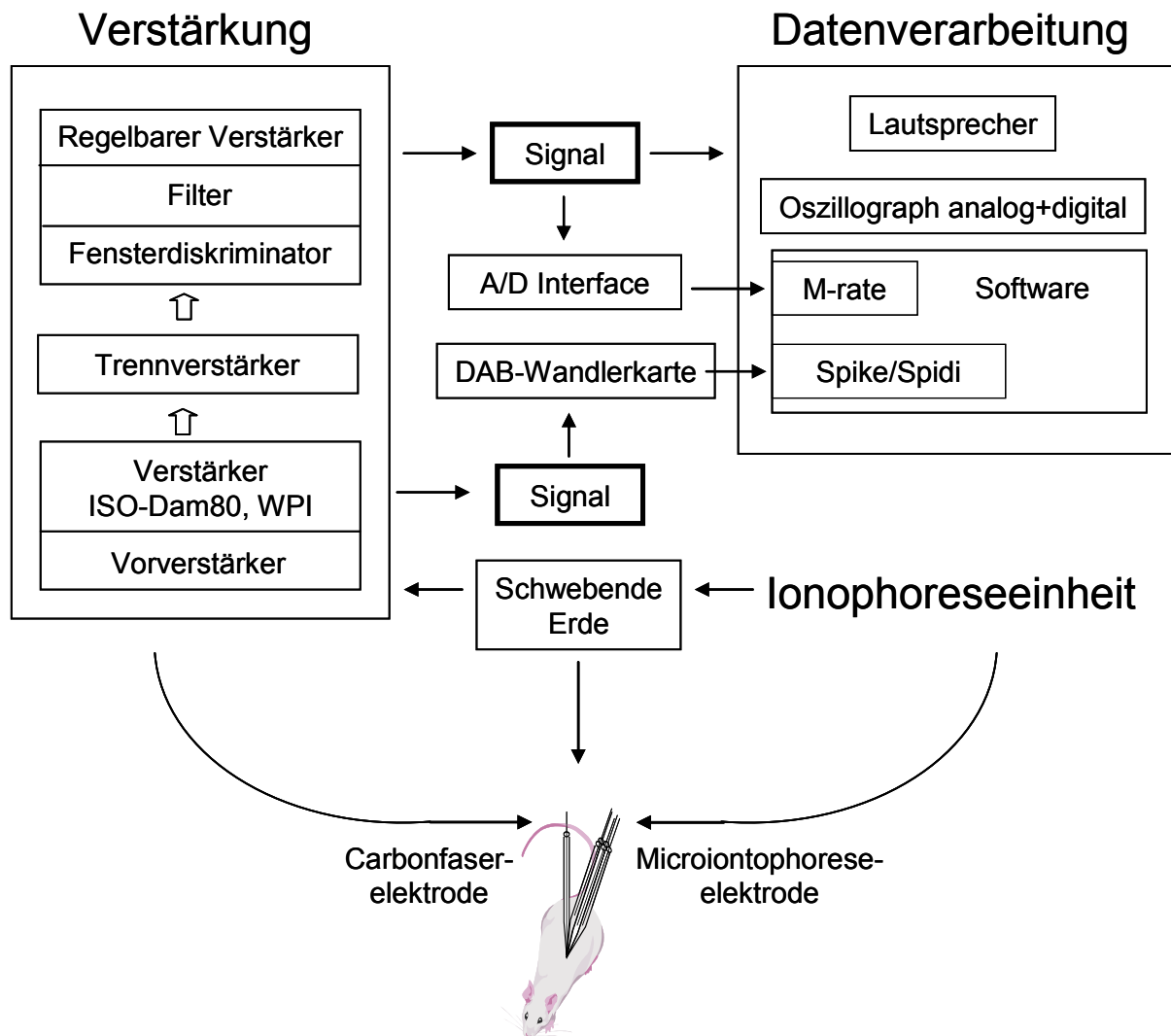


Abbildung 2.4: (Versuchsaufbau) man sieht den Versuchsaufbau schematisch dargestellt. Von der Carbonfaserelektrode werden die Aktionspotentiale von den Rückenmarkneuronen der Ratte abgeleitet. Dieses Signal wird durch verschiedenen Verstärker und Filter weiter geleitet in die Datenverarbeitung. Dort wird es zum einen akustisch und graphisch dargestellt und zum anderen zur weiteren Verarbeitung durch verschiedene Softwareprogramme abgespeichert. Außerdem ist noch eine Ionophoreseeinheit vorhanden durch die über die Microiontophoreselektrode Substanzen direkt an das abgeleitete Neuron appliziert werden können.

2.3.2 Extrazelluläre Ableitung

Die Aktionspotentiale, die mit Hilfe der Carbonfaser extrazellulär gemessen werden konnten, wurden über mehrere Einheiten auf ca. das 10 000-fache verstärkt. Ein Vorverstärker, ISO-DAM 80 (WPI, New Haven, USA) und ein Trennverstärker (DAM80-E, WPI) werden in Reihe geschaltet. Dieses Rohsignal wurde zum einen zu einem Datenverarbeitungsprogramm (s. n.) weitergeleitet, zum anderen zu einem Differenzverstärker mit nachgeschaltetem Filter. Der für die Auswertung relevante Frequenzbereich wurde durch einen Hoch- und Tieffrequenzfilter eingegrenzt. Außerdem wurden durch einen Fensterdiskriminator Aktionspotentiale mit einer bestimmten Amplitudenhöhe eingegrenzt. Dieses zweite Signal wurde zu einem Oszilloskop, einem Lautsprecher und zu einem Interface weitergeleitet.

2.3.3 Datenaufzeichnung

Das verstärkte Signal wurde durch verschiedene Systeme sichtbar gemacht und verarbeitet. Mit einem Lautsprecher konnte das gefilterte Signal wahlweise gefenstert oder unfenstert, akustisch wahrgenommen werden. Über ein A/D Interface (CED 1401, Science Park Cambridge, England) wurden die gefilterten und gefensterten Aktionspotentiale schließlich in dem Softwareprogramm m-rate, in Form von Peri-Stimulus-Zeit-Histogrammen als zusätzliche Sicherheitskopie gespeichert. Um während der Versuchszeit zu kontrollieren, welche Aktionspotentiale dort aufgenommen wurden, wurden die Signale in gleicher Form in einem analogen Oszilloskop (HM305-2, Hameg instruments, Frankfurt) sichtbar dargestellt. Für die endgültige Auswertung wurde das Softwareprogramm SPIKE/SPIDI (Forster und Handwerker, 1990) benutzt. Hier wurde das ungefilterte und unfensterte Signal aufgezeichnet, über eine Digital-Analog-Wandler Karte in den Computer eingespeist und konnte nach Abschluss der Aufzeichnung ausgewertet werden. Dabei wurden die Aktionspotentiale nach Form und Größe sortiert. Auf einem zusätzlichen, digitalen Oszilloskop (Classic 6000, Gould, Eastlake, USA) wurde während des Versuchs das Signal gefiltert dargestellt, um sicher zu gehen, dass die Antworten des richtigen Neurons aufgezeichnet wurden und um jegliche Veränderungen sofort erkennen zu können.

2.4 Versuchsvorbereitung

2.4.1 Geeignete Neurone

Um Neurone mit Eingang vom Kniegelenk zu finden, wurde die Elektrode auf der Höhe von L_1 - L_4 , wo der in 2.2.4 beschriebene Pool angelegt worden war, unter mikroskopischer Kontrolle manuell auf die Oberfläche des Rückenmarks aufgesetzt. Mit Hilfe eines Schrittmotors wurde die Elektrode in Schritten von ca. 10 μm vorwärts geschoben, bis maximal zu einer Tiefe von 1200 μm . Gleichzeitig wurde wiederholt manueller Druck auf das Knie ausgeübt, bis auf dem Oszilloskop und über Lautsprecher Aktionspotentiale eines einzelnen Neurons wahrgenommen werden konnten.

2.4.2 Qualität des gefundenen Neurons

Wenn die Amplitude des Aktionspotentials ca. dreimal höher war als das Hintergrundrauschen und sicher war, dass nicht mehrere, schwer zu unterscheidende Spikeformen vorhanden waren, wurde getestet, ob das Neuron für den Versuch geeignet war. Für die Experimente wurden Hinterhornneurone gewählt, die auf mechanische Druckreize am Kniegelenk antworteten. Wichtig war, dass es sich entweder um Wide-dynamic-range Neurone, die sowohl auf Druck als auch auf schmerzhaft Reize reagierten, oder um nozizeptiv-spezifische Neurone, die nur auf hochschwellige Reize am Kniegelenk reagierten, handelte. Hierfür wurde mit einer Pinzette durch äußeren Druck auf die Gelenkkapsel, ein schmerzhafter Reiz im Gelenkspalt ausgelöst, und das Kniegelenk und die Muskeln mit der Hand stark komprimiert. Kutane rezeptive Felder über dem Knie wurden durch Bestreichen und Kneifen der Haut mit einer Pinzette getestet. Neurone mit kutanen rezeptiven Feldern über dem Knie wurden nicht für die Versuche verwendet.

2.4.3 Antwortverhalten auf AMPA und NMDA

Nachdem man ein geeignetes Neuron gefunden hatte, testete man abwechselnd die Antworten auf AMPA und NMDA mit verschiedenen Stromstärken, um die optimalen Applikationsströme zu finden, die sichere Antworten lieferten. Die Größe der Antworten wurde über die Stromstärke so eingestellt, dass genug Spielraum für eine Zu- und Abnahme der Antwort vorhanden war.

2.5 Versuchsablauf

2.5.1 Abwechselnde Applikation von AMPA und NMDA

Wenn die Größe der Antworten stabil war, wurde mit dem Protokoll begonnen. Dazu wurde abwechselnd AMPA und NMDA in einem Abstand von einer Minute appliziert. Die Applikation endete jeweils zehn Sekunden nach dem ersten Aktionspotential der Antwort. Notiert wurde dabei die Dauer bis zum ersten Aktionspotential und die Anzahl der Spikes pro Antwort, wobei man sich an den Peri-Stimulus-Histogrammen des Softwareprogramms m-rate orientieren konnte.

2.5.2 Protokoll

Das Protokoll (siehe auch Abbildung 2.5) begann mit der Applikation z. B. von AMPA zu Beginn einer Minute. Am Anfang der nächsten Minute wurde dann NMDA appliziert. So fuhr man für insgesamt 150 Minuten fort. Diese 150 Minuten wurden unterteilt in drei Einheiten zu jeweils 50 Minuten wie in Abbildung 2.5 sichtbar. In den ersten 50 Minuten befand sich in dem Trog auf dem Rückenmark 30 µl Tyrode. Dadurch sollte das Anfangsniveau der Antwortstärken (Baseline) festgestellt werden, um einen möglichen Effekt von anderen Substanzen (siehe dazu 2.5.4), die in den darauf folgenden 50 Minuten in den Trog gegeben wurden, zu vergleichen. Dazu wurde die Tyrodelösung mit einer Pipette unter mikroskopischer Sicht vorsichtig entfernt, und die zu untersuchende Substanz mit einer Pipette aufgetragen. Die Gefahr dabei war, bedingt durch unterschiedliche Flüssigkeitsspiegel und damit unterschiedliches Gewicht auf dem Rückenmark, dass sich die Oberfläche des Rückenmarks an hob oder senkte und der Abstand der Elektrode zum Neuron nicht mehr stimmte. Das war an der Größe des Aktionspotentials zu erkennen.

Außerdem bestand die Gefahr, dass zusätzliche Neurone mit in die Aufzeichnung gelangten und eine Unterscheidung schwierig wurde. Wenn solch ein Fall auftrat, und schon die Testsubstanzen auf dem Rückenmark aufgetragen waren, wurde das Experiment abgebrochen. Zusätzlich konnte durch die Manipulation das Neuron verletzt werden und vollständig verloren gehen. Nach 50 Minuten wurde die Testsubstanz wieder vorsichtig mit einer Pipette unter mikroskopischer Kontrolle durch die Tyrodelösung ersetzt, und die letzten 50 Minuten wurden abgeleitet.

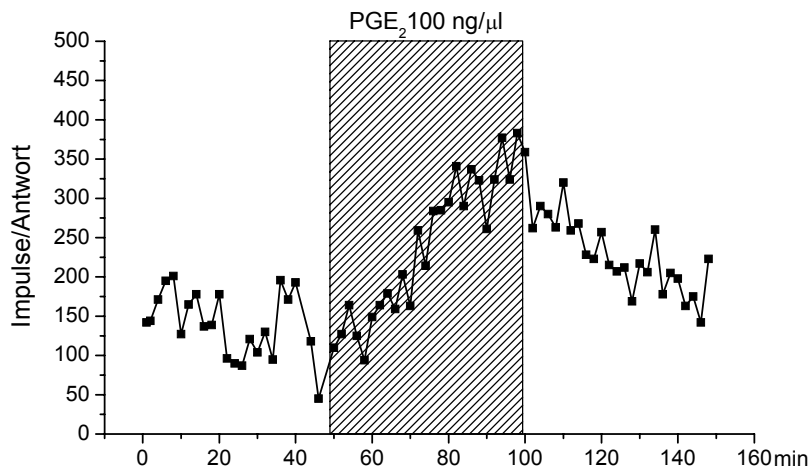


Abbildung 2.5: Beispiel für ein Standardprotokoll. Gezeigt wird die Antwort eines Neurons auf AMPA, vor, während und nach PGE₂-Applikation, bei entzündetem Knie. Jeder Punkt entspricht der Antwort des Neurons auf eine Applikation von AMPA.

2.5.3 Dokumentation und Statistik

Nach dem Versuch wurden mit Hilfe des Softwareprogramms SPIKE/SPIDI, siehe 2.3.3, die Aktionspotentiale des untersuchten Neurons nach Amplitudenhöhe und Form identifiziert, und die Anzahl pro Antwort ausgewertet. Als Antwort zählte die Anzahl der Aktionspotentiale in den zehn Sekunden nach dem ersten Spike. Zur Darstellung der gemittelten Werte wurde der Durchschnitt der Antworten in den

ersten 50 Minuten, also die Baseline als 100 % gesetzt, und alle Antworten als Prozentsatz der Baseline ausgedrückt. Zum Vergleich benutzte man den Wilcoxon Rangtest für gepaarte Werte, wobei Signifikanz bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ angenommen wurde.

2.5.4 Substanzen

Mit dem beschriebenen Versuchsprotokoll wurden folgende Substanzen untersucht:

1. **PGE₂** (100 ng/μl, Cayman Chemical, Ann Arbor, USA) wurde an neun Zellen von unbehandelten Tieren getestet und an zehn Zellen von Tieren mit entzündeten Knien. Diese Dosis wurde aus Verhaltensexperimenten genommen, bei denen PGE₂ intrathekal appliziert wurde (Vanegas und Schaible 2001). PGE₂ wurde als Trockensubstanz in Alkohol aufgenommen und mit Wasser zu einer Stammlösung verdünnt und anschließend zu jeweils 50 μl eingefroren. Die Endkonzentration an Alkohol betrug 0,07%. Um 500 μl PGE₂ für die Experimente herzustellen, wurden 50 μl von dieser PGE₂-haltigen Stammlösung verwendet, und diese mit 450 μl Tyrode vermischt.
2. **Indomethacin** (8 mM), ein Prostaglandinsynthesehemmer (Hemmer der Cyclooxygenase I und II), wurde bei sechs Tieren mit entzündeten Knien verwendet. Um eine Lösung von 8 mM Indomethacin mit einem pH-Wert von 7,5 herzustellen, benötigte man folgende Substanzen: 50 mg Indomethacin, 27,1 mg Natriumdihydrogenphosphat, 12 mg Natriumhydroxid, 10 ml Wasser, 7 ml isotone Kochsalzlösung (kein Tyrode!), ungefähr 7 μl 37%ige Salzsäure zur Einstellung des pH-Werts auf 7,5.

Kapitel 3: Ergebnisse

3.1 Charakteristika der Neurone

Die abgeleiteten Neurone befanden sich in Tiefen zwischen 595 μm und 1200 μm von der dorsalen Oberfläche des Rückenmarks. Durchschnittlich lagen sie bei 931 μm , also in den tiefen Laminae, ca. Lamina V bis VI. Insgesamt wurden 34 Neurone untersucht. Die Mehrheit waren WDR-Neurone (wide dynamic range neurons, $n=23$), die stark auf schmerzhaftes und schwach auf nichtschmerzhaftes Reize mit reagierten. Von diesen Neuronen befanden sich 7 in Versuchstieren mit normalen Knien und 16 in Versuchstieren mit entzündeten Knien. Die restlichen 11 Neurone waren HT-Neurone (high-threshold neurons), die nur auf schmerzhaftes Reize wie starkes Komprimieren oder Kneifen des Knies mit einer spitzen Pinzette reagierten und nicht auf Bestreichen der Haut und leichten Druck auf das Kniegelenk. Von diesen Neuronen befanden sich 2 in Versuchstieren mit normalen Knien und 9 in Versuchstieren mit entzündeten Knien. Die rezeptiven Felder der WDR-Neurone erstreckten sich zusätzlich entweder über die Hüfte oder Sprunggelenk, oder Haut über der Hüfte, oder Pfote, oder Unterschenkel und Muskel, siehe auch Tabelle 3.1.1 und 3.1.2.

Tabelle 3.1.1:

Aufteilung der rezeptiven Felder von HT- und WDR-Neuronen bei Versuchstieren mit normalen Knien.

Neurone	Anzahl	Knie	Hüfte	Sprung- gelenk	Haut
HT	2	•			
WDR	4	•	•		
WDR	1	•	•	•	
WDR	2	•			•

Tabelle 3.1.2:

Aufteilung der rezeptiven Felder von HT- und WDR-Neuronen bei Versuchstieren mit entzündeten Knien.

Neurone	Anzahl	Knie	Hüfte	Ober- schenkel- muskel	Unter- schenkel	Sprung- gelenk	Pfote	Haut
HT	8	•						
HT	1	•				•	•	
WDR	3	•				•	•	
WDR	1	•						•
WDR	7	•	•					
WDR	1	•			•			
WDR	1	•		•		•		
WDR	1	•		•				
WDR	2	•				•		

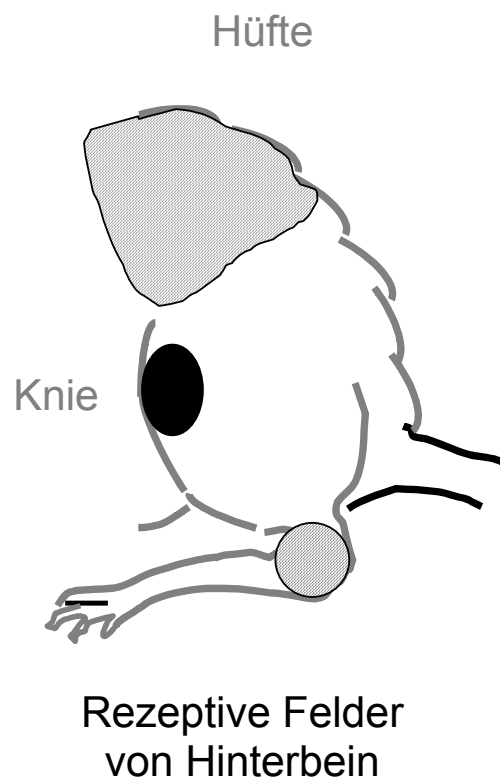


Abbildung 3.1: Skizze von dem Hinterlauf einer Ratte mit den wichtigsten rezeptiven Feldern der Neurone an Knie, Hüfte, Oberschenkelmuskel und Sprunggelenk. Das schwarz gezeichnete, rezeptive Feld am Knie war wegen der Selektion der Neurone in jedem untersuchten Neuron vorhanden. Zusätzliche, mögliche rezeptive Felder sind schraffiert dargestellt.

Nach Charakterisierung des rezeptiven Feldes der Neurone wurden AMPA oder NMDA appliziert. Die Ströme für AMPA lagen durchschnittlich bei -36 nA und für NMDA bei -117 nA.

3.2 Einfluss von PGE₂ auf das Antwortverhalten auf AMPA und NMDA

3.2.1 Versuchstiere mit normalem Knie

Um den Einfluss von PGE₂ auf Hinterhornneurone mit Glutamatrezeptoren zu untersuchen, wurde das Antwortverhalten auf AMPA und NMDA vor, während und nach lokaler Applikation von PGE₂ bei normalem Knie untersucht. Die spinale Applikation von PGE₂ verursacht in den Neuronen keine Entladungen. Somit hat PGE₂ die Neurone nicht direkt aktiviert. In Abbildung 3.2 sieht man ein repräsentatives Beispiel für ein Experiment, bei dem PGE₂ auf das Rückenmark eines Versuchstiers mit gesundem Knie appliziert wurde, wobei hier die Wirkung speziell auf das Antwortverhalten auf AMPA dargestellt wurde. Wie sich auch später in der statistischen Auswertung (siehe Abbildung 3.4) mit dem Wilcoxon-Rangtest für gepaarte Werte zeigte, konnte man bei insgesamt neun Neuronen keinen signifikanten Einfluss von PGE₂ auf das Antwortverhalten auf AMPA bei normalem Knie erkennen.

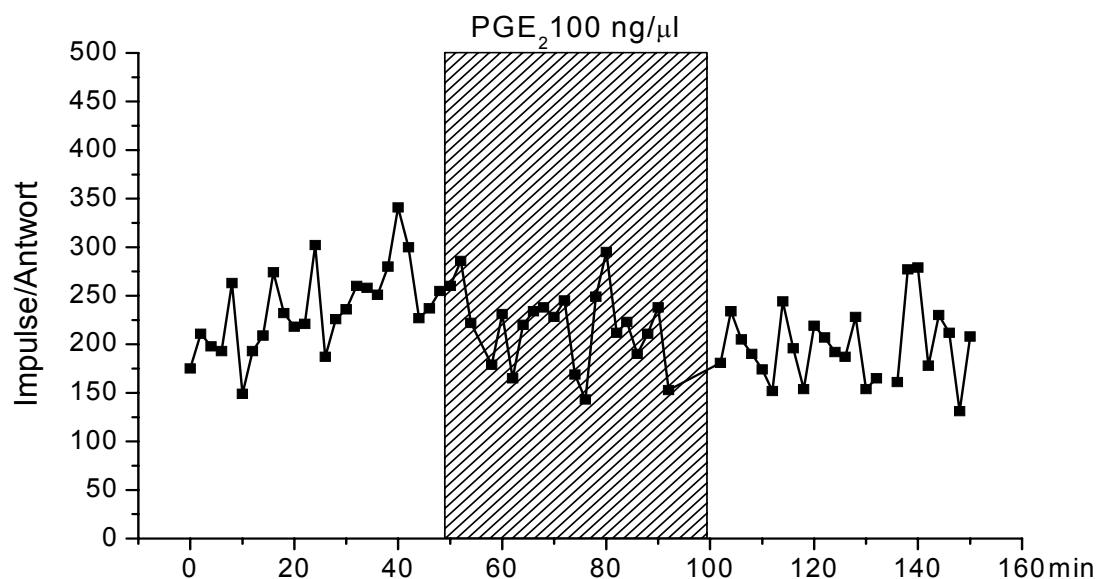


Abbildung 3.2: Beispiel für die Antworten eines Neurons auf AMPA, vor, während und nach spinaler PGE₂-Applikation, bei einem Versuchstier mit normalem Knie, wobei jeder einzelne Punkt eine Antwort auf AMPA darstellt. Hier hat die PGE₂-Applikation keinen Effekt.

In Abbildung 3.3 sieht man ein Beispiel für ein Experiment, in dem die Wirkung auf die Applikation von NMDA dargestellt wird. Nach PGE₂-Applikation nehmen die Antworten auf NMDA deutlich zu, wobei dieser Effekt in den zweiten 25 Minuten nach PGE₂-Applikation größer war als in den ersten 25 Minuten. Dabei wurde bei den neun abgeleiteten Neuronen ein Effekt nachgewiesen. In Abbildung 3.4 ist die gemittelte Auswertung sichtbar. Die Antworten auf NMDA steigen auf 162 % der Baseline signifikant an ($p = 0,015$, Wilcoxon-Rangtest).

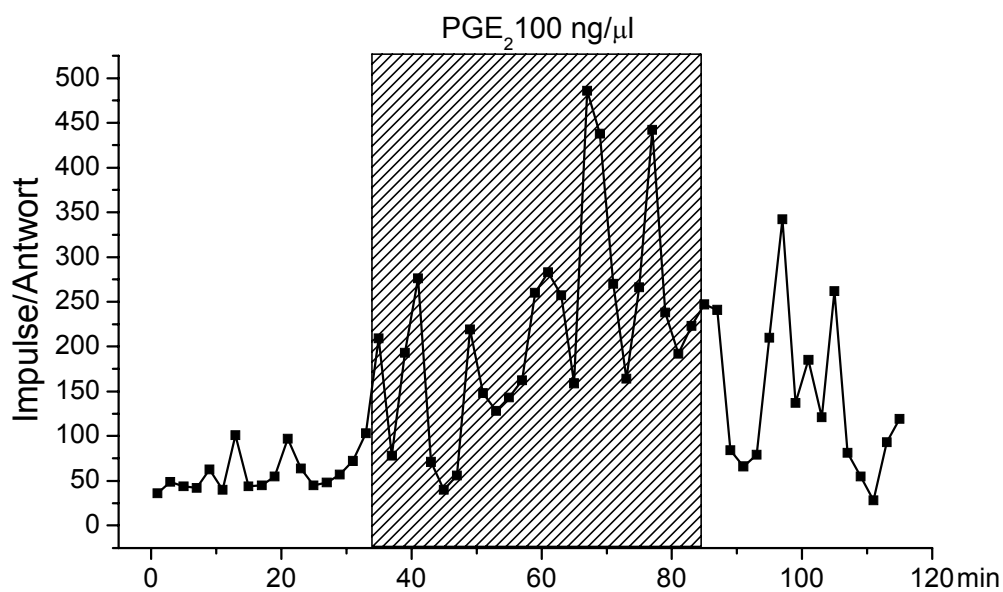


Abbildung 3.3: Beispiel für die Antwort eines Neurons auf NMDA, vor, während und nach spinaler PGE₂-Applikation, bei einem Versuchstier mit normalem Knie. Hier verursacht die PGE₂-Applikation einen signifikanten Anstieg.

Wie in den Abbildungen 3.2, 3.3 und 3.4 sichtbar, reduzierte sich die Zahl der Aktionspotentiale auf AMPA oder NMDA wieder, nachdem PGE₂ in den letzten 50 Minuten der Ableitung durch Tyrode ersetzt wurde. Die Größe der Antworten erreicht wieder das Ausgangsniveau vor PGE₂-Applikation (AMPA 87 %, NMDA 109 % des Durchschnittswerts vor Applikation).

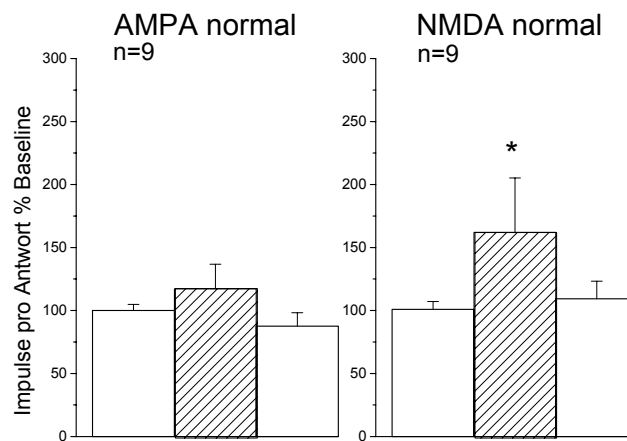


Abbildung 3.4: Wirkung von PGE₂ auf das Antwortverhalten von Rückenmarkneuronen auf AMPA und NMDA bei normalem Knie. Die Säulendiagramme zeigen den Durchschnitt der Antworten 25 Minuten vor PGE₂-Applikation, den Durchschnitt der Antworten 26-50 Minuten nach dem Auftragen von PGE₂ und den Durchschnitt der Antworten in den 25 Minuten nach dem Auswaschen von PGE₂, ausgedrückt in Prozentsen der Baseline (Standardfehler * $p < 0.05$ vs. Baseline, Wilcoxon-Rangtest).

3.2.2 Versuchstiere mit entzündetem Knie

Um die Wirkung von PGE₂ unter pathologischen Bedingungen zu untersuchen, wurde das gleiche Protokoll bei Versuchstieren mit entzündeten Knien durchgeführt. Im nächsten Beispiel (Abbildung 3.5) sieht man bei den Antworten auf AMPA einen Anstieg durch die Applikation von PGE₂. Bei der späteren statistischen Auswertung von insgesamt 12 Neuronen ergibt sich bei den Antworten auf AMPA ein signifikanter Anstieg ($p=0,0019$, Wilcoxon-Test) durch die Applikation von PGE₂ bis auf durchschnittlich 170 % der Baseline (siehe auch Abbildung 3.7).

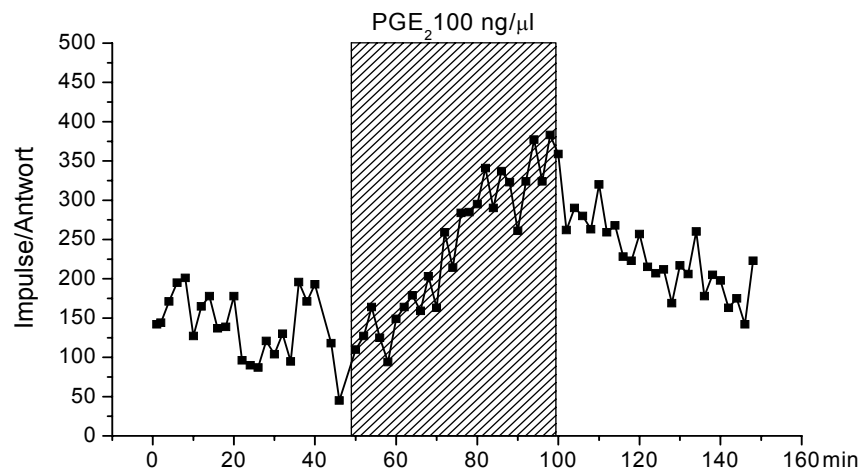


Abbildung 3.5: Beispiel für die Antworten eines Neurons auf AMPA, vor, während und nach spinaler PGE₂-Applikation, bei einem Versuchstier mit entzündetem Knie. Hier kann man einen Anstieg der Antworten des Neurons auf AMPA durch die spinale PGE₂-Applikation erkennen.

In Abbildung 3.6 ist nun ein Beispiel für das gleiche Experiment, diesmal aber mit den Antworten auf NMDA zu sehen. Insgesamt wurden so bei zehn Neuronen die Antworten auf NMDA unter PGE₂-Einfluss untersucht (siehe Abbildung 3.6). Die Antworten auf NMDA stiegen unter Entzündung des Knies nach PGE₂-Applikation durchschnittlich bis auf 217 % der Baseline ($p = 0,0024$, Wilcoxon-Test).

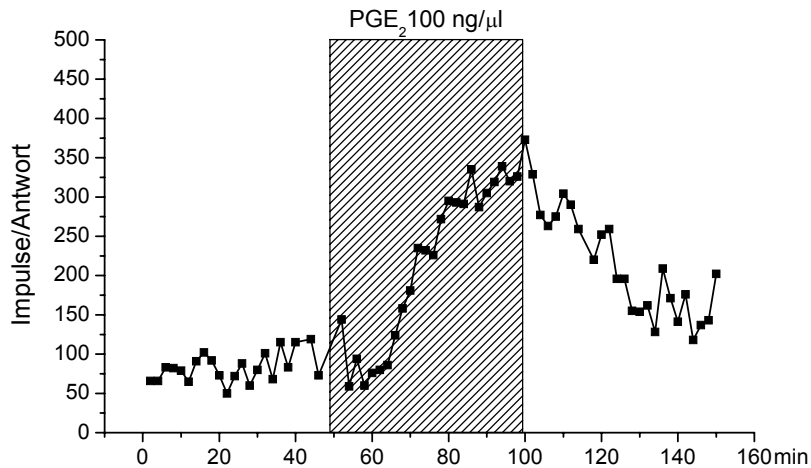
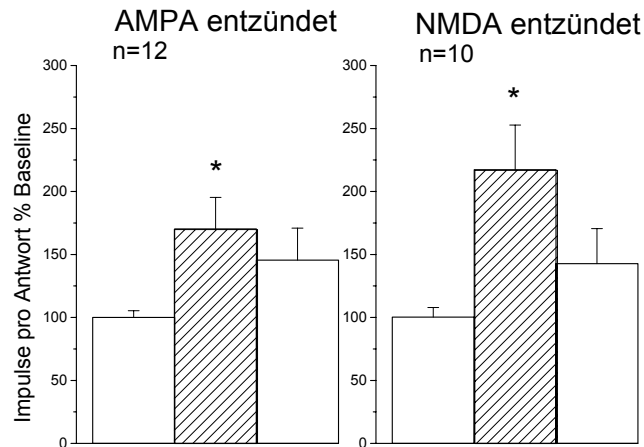


Abbildung 3.6: Beispiel für die Antworten eines Neurons auf NMDA, vor, während und nach spinaler PGE₂-Applikation, bei einem Versuchstier mit entzündetem Knie. Hier kann man einen Anstieg der Antworten des Neurons auf NMDA durch die spinale PGE₂-Applikation erkennen.

Wie unter nicht-entzündlichen Bedingungen fielen auch hier bei Versuchstieren mit entzündeten Knien die Antwortstärken auf AMPA und NMDA wieder ab, nachdem PGE₂ ausgewaschen und durch Tyrode ersetzt wurde. In Abbildung 3.7 sieht man, wie die Werte für AMPA auf 149 % der Baseline sanken, und die Werte für NMDA auf 142 % der Baseline fielen.



*Abbildung 3.7: Wirkung von PGE₂ auf das Antwortverhalten von Rückenmarkneuronen auf AMPA und NMDA bei entzündetem Knie. Die Säulendiagramme zeigen den Durchschnitt der Antworten 25 Minuten vor PGE₂-Applikation, den Durchschnitt der Antworten 26-50 Minuten nach der Applikation von PGE₂ und den Durchschnitt der Antworten in den 25 Minuten nach dem Auswaschen von PGE₂, ausgedrückt in Prozenten der Baseline. (Standardfehler * $p < 0,05$ vs. Baseline, Wilcoxon- Rangtest.)*

3.3 Wirkung von Indomethacin auf das Antwortverhalten der Neurone auf AMPA und NMDA bei Tieren mit entzündetem Knie

Um den Effekt von endogen produziertem PGE₂ im Rückenmark zu untersuchen, wurde ein Prostaglandinsyntheseshemmer auf das Rückenmark appliziert. Hierbei handelte es sich um Indomethacin (8 mM), das sowohl die Cyclooxygenase I wie auch die Cyclooxygenase II hemmt. Nach 50 Minuten Baseline wurde Indomethacin dorsal auf das Rückenmark gegeben. Nach weiteren 50 Minuten wurde Indomethacin durch Tyrode ersetzt. Wie in Abbildung 3.8 zu sehen, hat Indomethacin keinen signifikanten Effekt auf die Antworten auf AMPA und NMDA bei den fünf untersuchten Neuronen.

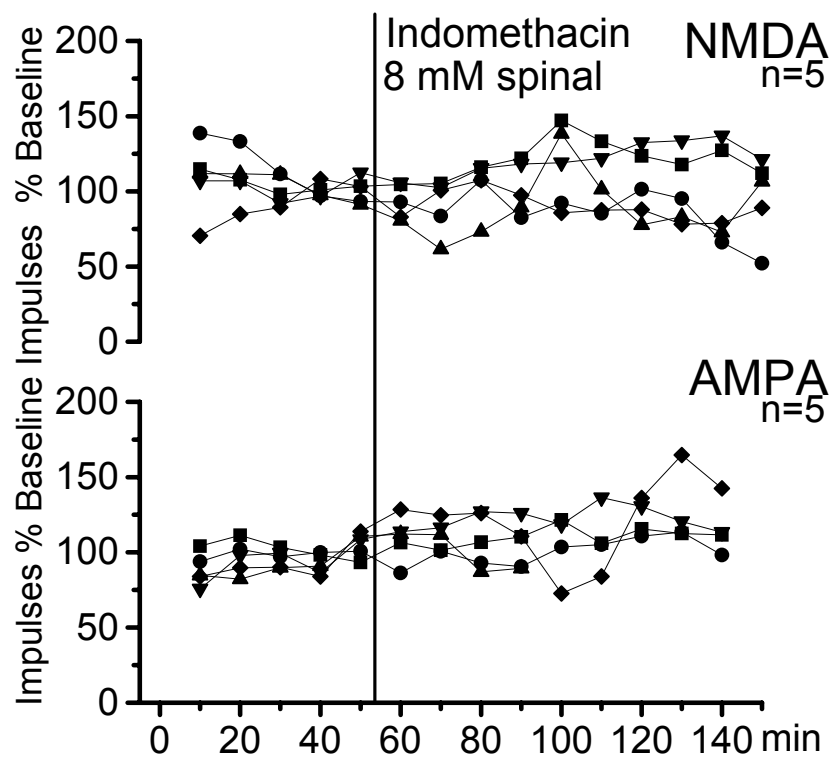


Abbildung 3.8: Wirkung von spinalem Indomethacin auf die neuronale Antwort auf AMPA und NMDA, bei Versuchstieren mit entzündetem Knie. Hierbei sieht man keinen Effekt von Indomethacin auf die neuronale Antwort auf AMPA und NMDA.

Kapitel 4: Diskussion

4.1 Diskussion der Methode

Durch die elektrophysiologische Ableitung konnten einzelne Neurone *in situ* untersucht werden. Ein bestimmtes Neuron konnte anhand der Form seiner Aktionspotentiale unterschieden werden, wobei die Software des Aufnahmesystems andersaussehende, elektrische Signale eliminierte. So ließen sich die Aktionspotentiale der neuronalen Reizantworten gut quantifizieren und aufzeichnen. Ebenso konnte man den Aktivitätszustand eines Neurons erkennen: Durch Entzündung voraktivierte Neurone waren leichter zu erregen.

Durch die Kombination von extrazellulärer Ableitung und Microiontophorese konnte man *in vivo* sehr geringe Mengen an Substanzen in die direkte Umgebung eines bestimmten Neurons im Rückenmark applizieren.

Nachteile der Microiontophorese bestehen vor allem darin, dass sowohl postsynaptische als auch präsynaptische Rezeptoren aktiviert werden, so dass der genaue Wirkort der applizierten Substanzen unbekannt bleibt. Zusätzlich misst eine extrazelluläre Ableitung nur Aktionspotentiale und kann nicht unterscheiden, ob der Effekt aufgrund post- oder präsynaptischer Vorgänge entstanden ist, oder ob ein Einfluss von anderen synaptisch verbundenen Neuronen, z. B. Interneuronen, besteht.

Die Schwierigkeit bei der Anwendung der extrazellulären Ableitungen in Kombination mit Microiontophorese bestand dennoch darin, ein geeignetes Neuron zu finden, es auch sicher zu charakterisieren und über mehrere Stunden zu halten. Wichtig dabei war, so nah an ein Neuron zu gelangen, dass dessen Aktionspotentiale eine ausreichender Größe hatte und auch stabile, wiederholbare und ausreichende Antworten auf die Applikation von AMPA und NMDA vorweisen konnte. Das Antwortverhalten und die Größe der Aktionspotentiale war abhängig von der Entfernung der Elektrode von dem Neuron. Bei jeder Manipulation am Rückenmark, z. B. beim Auftragen neuer Substanzen, bestand die Gefahr, dass sich das

Rückenmark im Verhältnis zur Pipettenspitze verschiebt, und sich dadurch auch das untersuchte Neuron mit verschiebt. Damit konnte sich die Qualität der Ableitung und Applikation verändern. Im Extremfall musste der Versuch abgebrochen werden, weil die Ableitung nicht mehr stabil war.

4.2 Wirkung von PGE₂ auf die Antwort von AMPA und NMDA

In einer parallel durchgeführten Studie verstärkte die Applikation von PGE₂ auf das Rückenmark die Antworten von Hinterhornneuronen auf mechanische Reizung des Kniegelenks, und es kam zu einer Erweiterung ihrer rezeptiven Felder (Vasquez et al. 2001). Diese Effekte ahmen die zentrale Sensibilisierung nach, die sich während einer Kniegelenkentzündung entwickelt. Bei Tieren mit einem entzündeten Gelenk war die Wirkung von spinal appliziertem PGE₂ wesentlich kleiner. Die spinale Applikation von Indomethacin, vor und während der Entstehung der Kniegelenkentzündung, konnte nicht die periphere Entzündung verhindern, aber sie verminderte deutlich die Entstehung von Übererregbarkeit in Rückenmarkneuronen. Die Applikation von Indomethacin 6-11 Stunden nachdem sich die Entzündung entwickelt hatte, konnte die erhöhten Antworten der Neurone nicht reduzieren (Vasquez et al. 2001). Demnach ist die endogene Prostaglandinsynthese in den primär afferenten Neuronen und/oder Rückenmarkneuronen wahrscheinlich notwendig und ausreichend für die Induktion der zentralen Sensibilisierung für mechanische Reize, aber nicht für ihre Aufrechterhaltung. In den hier dargestellten Experimenten wurde untersucht, welche Effekte PGE₂ und Indomethacin auf die Antworten der Neurone mit Gelenkafferenz auf AMPA und NMDA hatten.

4.2.1 Wirkung von exogen appliziertem PGE₂

Nach spinaler Applikation von PGE₂ zeigten die Neurone keine Entladungen. Somit hat PGE₂ die Neurone nicht direkt aktiviert, und eine Erhöhung der AMPA- und NMDA-Antworten durch zusätzliche postsynaptisch generierte Aktionspotentiale kann ausgeschlossen werden. Obwohl auch vereinzelte NMDA- und AMPA-Rezeptoren auf primären Afferenzen nachgewiesen wurden (Coggeshall und Carlton 1998), ist die Aktivierung dieser Primärafferenzen durch Glutamat so gering (Carlton et al. 1998), dass man davon ausgehen kann, dass die unmittelbaren, intensiven Antworten der Rückenmarkneurone auf NMDA und AMPA auf eine Aktivierung postsynaptischer Glutamatrezeptoren rückführbar ist.

Prostaglandine können an vier verschiedenen Rezeptoren (EP₁ - EP₄) angreifen, die an G-Protein gekoppelte sind. DRG-Neurone exprimieren sowohl den EP₁-Rezeptor (Oida et al. 1995) als auch den EP₃-Rezeptor, von dem verschiedene Isoformen bekannt sind, die auch unterschiedliche Effekte zeigen (Beiche et al. 1998b, Oida et al. 1998b, Sugimoto et al. 1995). Außerdem exprimieren sie noch den EP₄-Rezeptor (Oida et al. 1995). Die Rückenmarkneurone zeigen dagegen nur den EP₂-Rezeptor (Kawamura et al. 1997) auf. Da also Rezeptoren für PGE₂ sowohl an präsynaptischen Neuronen als auch an postsynaptischen Neuronen vorhanden sind, dürften spinale Effekte von natürlich freigesetztem oder von experimentell appliziertem PGE₂ auf die Nozizeption sowohl eine Wirkung auf zentrale Endigungen der primären Afferenzen als auch auf die Hinterhornneurone beinhalten.

Durch die vorliegenden Experimente wurde deutlich, dass PGE₂ auf die neuronalen Antworten auf Applikation von AMPA bei Versuchstieren mit normalen Knien keinen signifikanten Effekt hat. Vasquez et al. (2001) arbeitete am gleichen Tiermodell, dabei wurden aber die Antworten auf peripher mechanische Reizung untersucht. Es zeigte sich, dass spinal appliziertes PGE₂ die neuronalen Antworten auf mechanische Reizung des Kniegelenks steigert. Diese Steigerung kann den vorliegenden Ergebnissen zufolge nicht durch eine Wirkung von PGE₂ auf die AMPA-Rezeptoren erklärt werden und nicht durch eine Steigerung der präsynaptischen Glutamatfreisetzung durch PGE₂.

Hingegen konnten die Antworten auf NMDA durch spinale PGE₂-Applikation signifikant gesteigert werden. Die steigernde Wirkung von PGE₂ auf die Reizantworten auf noxische mechanische Reize (Vasquez 2001) könnte daher zumindest partiell auf eine Beeinflussung der NMDA-Rezeptorantworten zurückgeführt werden. Dies wird unterstützt durch die Tatsache, dass die Aktivierung von NMDA-Rezeptoren besonders bei der Verarbeitung nozizeptiver Reize eine wichtige Schlüsselrolle spielt (Neugebauer et al. 1993). Unter normalen Bedingungen reduzierte ein NMDA-Antagonist nur die Antworten auf schmerzhafte Reize, nicht aber auf nichtschmerzhafte Reize.

Bei Tieren mit entzündeten Kniegelenken wurden sowohl die Antworten auf AMPA als auch auf NMDA durch die Applikation von PGE₂ verstärkt. Eine periphere Entzündung führt zu einer Sensibilisierung zentraler und aus der Peripherie kommender Nervenendigungen sowie auch zu einer Übererregbarkeit postsynaptischer Neurone. Die beobachtete Steigerung der Antworten auf AMPA und NMDA kann sowohl durch prä- als auch durch postsynaptische Effekte von PGE₂ zustande kommen. Zum Beispiel könnte PGE₂ Substanzen aus den primären Afferenzen (z. B. Substanz P) freisetzen, die die Antworten von glutamatergen Rezeptoragonisten beeinflussen oder die Glutamatfreisetzung steigern.

Für einen präsynaptischen Angriffspunkt gibt es zahlreiche Hinweise. PGE₂ verstärkt unter anderem die Freisetzung von Substanz P und CGRP von kultivierten oder nativen DRG-Neuronen (Nicol et al. Andeeva and Rang 1993, Vasko et al. 1993, 1994, Hingtgen and Vasko 1994, Southall et al. 1998). Außerdem verringern NSAIDs die Freisetzung von Substanz P und CGRP aus DRG-Neuronen, soweit die Freisetzung mit Prostaglandinen verbunden ist (Andreeva und Rang 1993, Vasko et al. 1994). Weiterhin lässt die Applikation von PGE₂ die Frequenz von AMPA-Rezeptor vermittelten Miniatur-EPSPs in Rückenmarkneuronen ansteigen, nicht aber die Amplituden, was somit auch auf einen präsynaptischen Angriffspunkt hinweist (Minami et al. 1999).

Postsynaptische Angriffspunkte sind möglich, aber wenig untersucht. Kürzlich zeigte Baba et al. (2001) in Rückenmarksschnitten eine direkte, erregende Wirkung von

PGE₂ auf exzitatorische Rückenmarkneurone. Ein Zusammenhang mit glutamatergen Rezeptoren wurde jedoch nicht untersucht.

4.2.2 Hemmung der endogenen PGE₂-Synthese durch Indomethacin

Weil keine spezifischen Antagonisten für Prostaglandinrezeptoren erhältlich sind, wurde von Vasquez et al. (2001) Indomethacin, ein COX-1/COX-2 Inhibitor, auf das Rückenmark appliziert, bevor eine Kniegelenkentzündung induziert wurde. Dadurch wurde die Entwicklung der durch Entzündung ausgelösten mechanischen Übererregbarkeit signifikant gehemmt. Folglich ist die initiale Produktion von endogenem Prostaglandin in den primär afferenten Neuronen und/oder Rückenmarkszellen essentiell wichtig für die vollständige Entwicklung der entzündungsbedingten spinalen Übererregbarkeit.

In den vorliegenden Experimenten zeigte sich, dass die spinale Applikation von Indomethacin während einer akuten Entzündung die Antworten auf AMPA und NMDA nicht verminderte. Dies konnte auch für die Antworten auf mechanische Stimuli beobachtet werden (Vasquez et al. 2001). Somit scheint die Beeinflussung von glutamatergen Synapsen durch endogenes Prostaglandin nicht der Mechanismus zu sein, durch den die zentrale Sensibilisierung in dem untersuchten Zeitfenster (7-8 Stunden nach Entzündungsinduktion) aufrechterhalten wird. Da die Hemmung der Prostaglandinsynthese durch Indomethacin sehr rasch geschieht, hätte man eine Verringerung der Antworten nach spinaler Applikation sehen müssen, wenn eine kontinuierliche Produktion von Prostaglandinen im Rückenmark wichtig für die Aufrechterhaltung der spinalen Übererregbarkeit während der Entzündung gewesen wäre. Es scheint somit, dass die spinale Prostaglandinsynthese für die Aufrechterhaltung der zentralen Sensibilisierung nicht erforderlich ist, zumindest in der untersuchten Zeitperiode.

Durch systemische Gabe von Indomethacin jedoch konnten die Antworten auf mechanische Reize vermindert werden (siehe Vasquez et al. 2001). Das lässt darauf schließen, dass für die analgetische Wirkung von NSAIDs andere als die spinalen Angriffspunkte vorhanden sein müssen, zumindest in Beziehung auf mechanische

Stimulation. Der Wirkort ist demnach möglicherweise das entzündete Kniegelenk (siehe Heppelmann et al. 1983) oder supraspinale Strukturen wie z. B. der Hirnstamm (Vanegas et al. 1997).

Die fehlende Wirkung von spinal appliziertem Indomethacin nach der Entstehung der Entzündung könnte verschiedene Gründe haben. Erstens könnte keine weitere spinale Prostaglandinsynthese nach einer initialen Prostaglandinproduktion stattfinden, und dadurch würde auch Indomethacin nicht wirken. Dies scheint allerdings unwahrscheinlich, da die Steigerung der Synthese der Cyclooxygenase II im Rückenmark in den ersten Stunden der Entzündung beginnt und für viele Stunden und Tage (siehe Vanegas und Schaible 2001) anhält. Zudem wurde im gleichen Modell im untersuchten Zeitfenster eine spinale Freisetzung von PGE_2 gemessen (Ebersberger et al. 1999).

Zweitens verursachen Prostaglandine persistierende Effekte, möglicherweise verbunden mit einer Abnahme der Empfindlichkeit der spinalen Neurone für Prostaglandin. In der Tat waren die Effekte von PGE_2 auf die Antworten auf mechanische Stimulation nicht vollständig reversibel. Bei einer zweiten Applikation von PGE_2 im gleichen Experiment waren die Antwortsteigerungen durch PGE_2 geringer. Zusätzlich war bei Ratten mit einer Knieentzündung der Antwort-steigernde Effekt von PGE_2 auf mechanische Reizantworten viel weniger ausgeprägt (siehe Vasquez et al. 2001). Bei einer nachfolgenden Studie von Bär et al. (2004) mit Applikation von EP-Rezeptor-Agonisten auf das Rückenmark zeigte sich ebenfalls ein Bild, das die Bedeutung von spinalen Prostaglandinen für die Aufrechterhaltung entzündungsbedingter Übererregbarkeit in Frage stellt. Die Applikation von EP_1 -, EP_2 - und EP_4 - Agonisten auf das Rückenmark steigerte die Antworten der Rückenmarkneurone auf mechanische Reizung des normalen Kniegelenks wie PGE_2 oder eine periphere Entzündung. Wurden diese Agonisten erst nach Etablierung der Entzündung und der Übererregbarkeit appliziert, hatte der EP_2 - und EP_4 -Agonist keine Wirkung, nur der EP_1 -Agonist steigerte die Antworten auf mechanische Reizung des Kniegelenkes. Der fehlende Effekt von Indomethacin auf die Antworten auf AMPA und NMDA steht im Widerspruch zu den persistierenden Effekten von exogen appliziertem PGE_2 auf die Antworten von AMPA und NMDA in Ratten mit entzündetem Gelenk. Obwohl exogen appliziertes PGE_2 die Antworten verstärkt und

damit zeigt, dass PGE₂-Effekte möglich sind, lassen die negativen Effekte von Indomethacin eher den Schluss zu, dass endogene Prostaglandine nicht wesentlich an der Aufrechterhaltung der Übererregbarkeit der Rückenmarksneurone für exzitatorische Aminosäuren beteiligt sind. Die Konzentration bzw. metabolische Verfügbarkeit von PGE₂ an seinen Wirkorten könnte dafür verantwortlich sein.

4.3 Ausblick

Inzwischen stehen Agonisten für die einzelnen EP-Rezeptoren zur Verfügung. Da die EP-Rezeptoren an unterschiedliche second messenger-Systeme gekoppelt sind, können zukünftige Experimente klären, ob die Wirkung von PGE₂ auf die Antworten auf AMPA und NMDA an bestimmte second messenger-Wege gebunden ist. Aus dem Vergleich der Effekte von spezifischen Agonisten auf die Antworten auf mechanische Reizung des Gelenks und auf die Effekte von AMPA und NMDA könnten weitere Schlussfolgerungen darüber gezogen werden, ob die Erhöhung der AMPA- und NMDA-Effekte ursächlich an der Entstehung der Übererregbarkeit für mechanische Reize beteiligt ist.

Quellen

- Aanonsen LM, Wilcox GL. 1986. Phencyclidine selectively blocks a spinal action on N-methyl-D-Aspartate in mice. *Neuroscience Lett*, 67:191-197.
- Ahmadi S, Lippross S, Neuhuber WL, Zeilhofer HU. 2002. PGE(2) selectively blocks inhibitory glycinergic neurotransmission to rat superficial dorsal horn neurons. *Nature Neuroscience*, 5:34-40.
- Andeeva L, Rang HP. 1993. Effect of bradykinin and prostaglandins on the release of calcitonin gene-related peptide-like immunoreactivity from the spinal cord in vitro. *Br J Pharmacol*, 108:185-190.
- Ascher P, Nowak L. 1988. The role of divalent cations in the N-methyl-D-aspartate responses of mouse central neurones in culture. *J Physiol.*, 399:247-66.
- Baba H, Kohno T, Moore KA, Woolf CJ. 2001. Direct activation of rat spinal dorsal horn neurons by prostaglandin E2. *J Neuroscience*, 21:1750-1756.
- Bär KJ, Natura G, Telleria-Diaz A, Teschner P, Vogel R, Vasquez E, Schaible HG, Ebersberger A. 2004. Changes in the effect of spinal prostaglandin E2 during inflammation: Prostaglandin E (EP1-EP4) receptors in spinal nociceptive processing of input from the normal and inflamed knee joint. *J Neuroscience*, 24(3):642-651.
- Beiche G, Klein T, Nüsing R, Neuhuber W, Goppelt-Strube M. 1998. Localization of cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2 receptor EP3 in the rat lumbar spinal cord. *J Neuroimmunol*, 89:26-34.
- Basbaum AI, Jessell TM. 1999. The perception of pain. In: Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM (eds). *Principles of Neural Science*. 4. Edn. New York: McGraw-Hill, 472-491.

- Bennett GJ. 2000. Update on the neurophysiology of pain transmission and modulation: focus on the NMDA-receptor. *J Pain Symptom Manage*, 19(1):2-6.
- Beiche F, Scheuerer S, Brune K, Geisslinger G, Goppelt-Strube M. 1996. Up-regulation of cyclooxygenase-2 mRNA in the rat spinal cord following peripheral inflammation. *FEBS Letters*, 390:165-169.
- Biele C, Fels G. 2003. Aspirin: Strukturen, Biosynthese und biologische Wirkung von Prostaglandin. Department Chemie, Fakultät für Naturwissenschaften, Universität Paderborn: 2003 FIZ Chemie Berlin.
- Brand P, Yaney P. 1993. Pain, The Gift nobody wants. Harper Collins Publisher: 1993 New York.
- Campbell JN, Meyer RA. 1983. Sensitization of unmyelinated nociceptive afferents in monkey varies with skin type. *J Neurophysiol*. 19(1):98-110.
- Chapman V, Dickenson AH. 1992. The spinal and peripheral roles of bradykinin and prostaglandins in nociceptive processing in the rat. *Eur J Pharmacol*, 219:427-433.
- Coderre TJ, Melzack R. 1992. The contribution of excitatory amino acids to central sensitization and persistent nociception after formalin-induced tissue injury. *J. Neuroscience*, 12:3665-3670.
- Coleman RA, Smith WL, Narumiya S. 1994. International Union of Pharmacology classification of prostanoid receptors: properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes. *Pharmacol Rev.*, 46:205-229.
- Craig AD, Heppelmann B, Schaible HG. 1988. The projection of the medial and posterior articular nerves of the cat's knee to spinal cord. *J Comp Neurol*, 276:279-288.

- Davar G, Hama A, Deykin A, Vos B, Maciewicz R. 1991. MK-801 blocks the development of thermal hyperalgesia in a rat model of experimental painful neuropathy. *Brain Res.*, 553:327-330.
- Davies SN, Lodge D. 1987. Evidence for involvement of N-methylaspartate receptors in „wind-up“ of class 2 neurones in the dorsal horn of the rat. *Brain Res.*, 424:402-406.
- Dickenson AH. 1990. A cure for wind up: NMDA receptor antagonists as potential analgesics. *Trends Pharmacol Sci.* 11(8):307-9.
- Dickenson AH, Sullivan AF. 1990. Differential effects of excitatory amino acid antagonists on dorsal horn nociceptive neurones in the rat. *Brain Res.*, 506:31-9.
- Dirig DM, Konin GP, Isakson PC, Yaksh TL. 1997. Effect of spinal cyclooxygenase inhibitors in rat using the formalin test and in vitro prostaglandin E2 release. *Eur J Pharmacol*, 331:155-160.
- Dirig DM, Yaksh TL. 1999. In vitro prostanoid release from spinal cord following peripheral inflammation: effects of substance P, NMDA and capsaicin. *Br J Pharmacol*, 126:1333-1340.
- Dougherty PM, Palecek J, Paleckova V, Sorkin LS, Willis WD. 1992a. The role of NMDA and non-NMDA excitatory amino acid receptors in the excitation of primate spinothalamic tract neurons by mechanical, chemical, thermal and electrical stimuli. *J. Neurosci.*, 12:3025-3041.
- Dougherty PM, Sulka KA, Sorkin LS, Westlund KN, Willis WD. 1992b. Neural changes in acute arthritis in monkeys. I. Parallel enhancement of responses of spinothalamic tract neurons to mechanical stimulation and excitatory amino acids. *Brain Res Rev.*, 17:1-13.

Ebersberger A, Grubb BD, Willingale HL, Gardiner NJ, Nebe J, Schaible HG. 1999. The intraspinal release of prostaglandin E2 in a model of acute arthritis is accompanied by up-regulation of cyclo-oxygenase-2 in the spinal cord. *Neuroscience*, 93:775-781.

Fölsch UR, Kochsiek K, Schmidt RF. 2000. *Pathophysiologie*. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag, 55-68.

Grigg P, Schaible HG, Schmidt RF. 1986. Mechanical sensitivity of group III and IV afferents from posterior articular nerve in normal and inflamed cat knee. *J Neurophysiol.*, 55:635-43.

Handwerker HO. 1998. *Einführung in die Pathophysiologie des Schmerzes*. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag, 1-109.

Handwerker HO. 1995. Vom Schmerz zur Schmerzkrankheit – Neue Erkenntnisse aus der Schmerzforschung. Sonderdruck aus SANDORAMA 3/1995, Nürnberg: Sandoz AG.

Hardy JD, Wolff HG, Goodell H. 1950. Experimental evidence on the nature of cutaneous hyperalgesia. *J Clin. Invest.*, 29 :115-140.

Hay CH, de Belleruche JS. 1997. Carrageenan-induced hyperalgesia is associated with increased cyclooxygenase-2 expression in spinal cord. *NeuroReport*, 8:1249 -1251.

Hingtgen CM, Waite KJ, Vasko MR. 1995. Prostaglandins facilitate peptide release from rat sensory neurons by activating the adenosine 3', 5'-cyclic monophosphate transduction cascade. *J Neuroscience* 15:5411-5419.

Hingtgen CM, Vasko MR. 1994. Prostacyclin enhances the evoked-release of substance P and calcitonin gene-related peptide from rat sensory neurons. *Brain Res*, 655:51-60.

- Hylden JLK, Nahin RL, Traub RJ, Dubner R. 1989. Expansion of receptive fields of spinal lamina I projection neurons in rats with unilateral adjuvant-induced inflammation: the contribution of dorsal horn mechanisms. *Pain*, 37:229-243.
- Hua XY, Chen P, Marsala M, Yaksh TL. 1999. Intrathecal substance P- induced thermal hyperalgesia and spinal release of prostaglandin E2 and amino acids. *Neuroscience*, 89:525-534.
- Iadarola JM, Caudle RM. 1997. Good pain, bad pain. *Science*, 278:239-40.
- Kawamura T, Yamauchi T, Koyama M, Maruyama T, Akiara T, Nakamura N. 1997. Expression of prostaglandin EP2 receptor mRNA in the rat spinal cord. *Life Science*, 61:2111-2116.
- Kobayashi S, Kokubo Y, Uchida K, Yayama T, Takeno K, Negoro K, Nakajima H, Baba H, Yoshizawa H. 2005. Effect of lumbar nerve root compression on primary sensory neurons and their central branches: Changes in the nociceptive neuropeptides substance P and somatostatin. *Spine*, 30(3):276-282.
- MacDermott AB, Mayer ML, Westbrook GL, Smith SJ, Barker JL. 1986. NMDA-receptor activation increases cytoplasmic calcium concentration in cultured spinal cord neurones. *Nature*, 321(6069):519-22.
- Mao J, Price DD, Hayes RL, Lu J, Mayer DL. 1992a. Differential roles of NMDA and non-NMDA receptor activation in induction and maintenance of thermal hyperalgesia in rats with painful peripheral mononeuropathy. *Brain Res.*, 598:271-278.
- Mao J, Price DD, Hayes RL, Lu J, Mayer DL. 1992b. Intrathecal MK-801 and local nerve anesthesia synergistically reduce nociceptive behaviors in rats with experimental peripheral mononeuropathy. *Brain Res.*, 576:254-262.
- Mense S. Pathophysiological basis of muscle pain syndromes. *Myofasc.* 1997. *Pain-*

Update in Diagnosis and treatment; 8:23-53.

Meßlinger K. 1997. Was ist ein Nozizeptor. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag: Schmerz 1997, 11:353-366.

Minami T, Okuda-Ashitaka E, Hori Y, Sakuma S, Sugimoto T, Sakimura K, Mishina M, Ito S. 1999. Involvement of primary afferent C-fibers in touch-evoked pain (allodynia) induced by prostaglandin E2. Eur J Neuroscience, 11:1849:1856.

Minami T, Nishihara I, Uda R, Ito S, Hyodo M, Hayaishi O. 1994. Characterization of EP-receptor subtypes involved in allodynia and hyperalgesia induced by intrathecal administration of prostaglandin E2 to mice. Br J Pharmacol 112:735-740.

Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer HK, Schäfer-Korting M. 2001. Anlagetika. Mutschler Arzneimittelwirkung. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, 205-237.

Nakamura-Craig M, Gill BK. 1991. Effect of neurokinin A, substance P and calcitonin gene related peptide in peripheral hyperalgesia in the rat paw. Neurosci Lett. 124(1):49-51.

Narumiya S, Sugimoto Y, Ushikubi F. 1999. Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. Physiol. Rev., 79:1193-1226.

Negishi M, Sugimoto Y, Ichikawa A. 1995. Molecular mechanisms of diverse actions of prostanoid receptors. Biochim. Biophys. Acta, 1259:109-120.

Neugebauer V, Lücke T, Schaible HG. 1993a. Differential effects of N-

- methyl-D- aspartate (NMDA) and non-NMDA receptor antagonists on the responses of rat spinal neurons with joint input. *Neuroscience Lett.*, 155:29-32, 1993a.
- Neugebauer VT, Lücke, Schaible HG. 1993b. N-methyl-D-aspartate (NMDA) and non-NMDA receptor antagonists block the hyperexcitability of dorsal horn neurons during development of acute arthritis in rat's knee joint. *Journal of Neurophysiology* 70(4):1365-77.
- Neugebauer V, Schaible HG. 1990. Evidence for a central component in the sensitisation of spinal neurons with joint input during development of acute arthritis in cats knee. *Journal of Neurophysiology*, 64:299-311.
- Nicol GD, Klingberg DK, Vadko MR. 1992. Prostaglandin E2 increases calcium conductance and stimulates release of substance P in avian sensory neurons. *Journal of Neuroscience*, 12:1917:1927.
- Nowak L, Bregestovski P, Ascher P, Herbet A, Prochiantz A. 1984. Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurons. *Nature*, 307(5950):432-5.
- Oida H, Namba T, Sugimoto Y, Ushikubi F, Ohishi H, Ichikawa A, Narumiya S. 1995. Situ hybridization studies of prostacyclin receptor mRNA expression in various mouse organs. *Br J Pharmacol*, 116:2828-2837.
- Perl ER, Kumazawa T, Lynn B, Kenins P. 1976. Sensitization of high threshold receptors with unmyelinated (C) afferent fibers. *Prog Brain Res.*, 43:263-77.
- Ren K, Hylden JLK, Williams GM, Ruda MA, Dubner R. 1992. The effects of a non-competitive NMDA receptor antagonist, MK-801, on behavioral hyperalgesia and dorsal horn neuronal activity in rats with unilateral inflammation. *Pain*, 50:331-334.
- Samad TA, Moore KA, Sapirstein A, Billet S, Allchorne A, Poole S, Bonventre JV,

- Woolf CJ. 2001. Interleukin 1- β - mediated induction of cox-2 in the CNS contributes to inflammatory pain hypersensitivity. *Nature*, 410:471-475.
- Schaible HG, Richter F. 2004. Pathophysiologie of pain. *Langenbecks Arch Surg*. 2004 Mar 18, in press.
- Schaible HG. 1997. Neurobiologische Grundlagen der Schmerzhaftigkeit funktionsgestörter Gelenke. *Manuelle Medizin*, 35:77-81, Originalien. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag.
- Schaible HG, Grubb BD. 1993. Review Article: Afferent and spinal mechanisms of joint pain. *Pain*, 55:5-54.
- Schaible HG, Neugebauer V, Grubb BD, Oppmann M. 1991a. The effects of NMDA-antagonists on neuronal activity in cat spinal cord evoked by acute inflammation in the knee joint. *Eur. Journal of Neuroscience*, 3:981-991.
- Schaible HG, Schmidt RG. 1988. Time course of mechanosensitivity changes in articular afferents during a developing experimental arthritis. *J Neurophysiol.*, 60:2180-2195.
- Seltzer Z, Cohn S, Ginzburg R, Beilin BZ. 1991. Modulation of neuropathic pain behavior in rats by spinal disinhibition and NMDA receptor blockade of injury discharge. *Pain*, 45:69-75.
- Smith MT, Edwards RR, Robinson RC, Dworkin RH. 2004. Suicidal ideation, plans, and attempts in chronic pain patients: factors associated with increased risk. *Pain*, 111(1-2):201-8.
- Sorkin LS. 1993. IT ketorolac blocks NMDA-evoked spinal release of prostaglandin E2 (PGE2) and thromboxane B2 (TBXB2). *Anesthesiology*, 79:A908.
- Southall MD, Michael RL, Vasko MR. 1998. Intrathecal NSAIDs attenuate

- inflammation induced neuropeptide release from rat spinal cord slices. *Pain*, 78:39-48.
- Stone TW. 1985. Microiontophoresis and pressure ejection. New York, Brisbane Toronto, Singapore: John Wiley and Sons, Chichester, 1-23.
- Sugimoto Y, Shigemoto R, Namba T, Negishi M, Mizuno N, Narumiya S, Ichikawa A. 1994. Distribution of the messenger RNA for the prostaglandin E receptor subtype EP3 in the mouse nervous system. *Neuroscience*, 62:919-928.
- Thompson SWN, King AE, Woolf CJ. 1990. Activity-dependent changes in rat ventral horn neurons in vitro; summation of prolonged afferent evoked postsynaptic depolarizations produce a D-2-amino-5-phosphonovaleric acid sensitive windup. *Eur. Journal of Neuroscience*, 2:638-649.
- Treede RD, Kenshalo DR, Gracley RH, Jones AKP. 1999. The cortical representation of pain. *Pain*, 79:105-111.
- Uda R, Horiguchi S, Ito S, Hyodo M, Hayaishi O. 1990. Nociceptive effects induced by intrathecal administration of prostaglandin D2, E2, or F2 alpha to conscious mice. *Brain Res.*, 510:26-32.
- Vane JR, Barkley JS, Botting RM. 1998. Cyclooxygenase 1 and 2. *Annu. rev. Pharmacol. Toxicol.*, 38:97-120.
- Vanegas H, Schaible HG. 2001. Prostaglandins and cyclooxygenases in the spinal cord. *Prog Neurobiol.*, 64:327-363.
- Vasko MR. 1995. Prostaglandin-induced neuropeptide release from spinal cord. *Prog Brain Res.*, 104:367-380.
- Vasko MR, Campbell WB, Waite KJ. 1994. Prostaglandin E2 enhances bradykinin-stimulated release of neuropeptides from rat sensory neurons in culture. *Journal of Neuroscience*, 14:4987-4997.

- Vasko MR, Zirkelbach SL, Waite KJ. 1993. Prostaglandins stimulate the release of substance P from rat spinal cord slices. *Prog Pharmacol Clin Pharmacol*, 10:69-89.
- Vasquez E, Bär KJ, Ebersberger A, Vanegas H, Schaible HG. 2001. Spinal prostaglandin E2 modifies the mechanosensitivity of spinal cord neurons and the development of inflammation-evoked hyperexcitability. *Pflügers Arch, Eur J Physiol Suppl to Vol.*, 441, No 6:R156.
- Vasquez E, Bär K, Ebersberger A, Klein B, Vanegas H, Schaible HG. 2000. Influence of PGE2 on spinal nociceptive processing in rats with normal and inflamed knee joints. (Neuroscience-Meeting).
- Watkins JC, Evans RH. 1981. Excitatory amino acid transmitters. *Annu Rev. Pharmacol Toxicol.*, 21:165-204.
- Willingale HL, Gardiner NJ, McLymot N, Giblett S, Grubb BD. 1997. Prostanoids synthesized by cyclooxygenase isoforms in rat spinal cord and their contribution to the development of neuronal hyperexcitability. *Br J Pharmacol*, 122:1593-1604.
- Willis WD .1994. Central plastic responses to pain. In: G.F. Gebhardt, D.L. Hammond and T.S. Jensen, *Proc. 7th World Congress on Pain, Progress in Pain Research and Management*, Seattle: IASP Press. 301-324.
- Woolf CJ. 1983. Evidence for a central component of post injury pain hypersensitivity. *Nature*, 306:686-688.
- Woolf CJ, Thompson SWN. 1991. The induction and maintenance of central sensitization is dependent on N-methyl-D-aspartic acid receptor activation; implications for the treatment of post-injury pain hypersensitivity states. *Pain*, 44:293-299.

Yang LC, Marsala M, Yaksh TL. 1996b. Effect of spinal kainic acid receptor activation on spinal amino acid and prostaglandin E2 release in rat. *Neuroscience*, 75:453-461.

Anhang

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Hans-Georg Schaible für die Überlassung des Promotionsthemas sowie für seine Unterstützung bei der Durchführung und Fertigstellung dieser Arbeit.

Weiterhin bin ich Frau Dr. rer. nat. Andrea Ebersberger für Ihre geduldige Beratung und Ihre praktische sowie mentale Unterstützung, sowohl bei den Experimenten als auch bei der Durchführung der gesamten Arbeit, zu großem Dank verpflichtet.

Weiterhin gilt mein Dank Herrn Enrique Vasquez für die praktische Unterstützung in den Experimenten.

Für die gewissenhafte Vorbereitung der Versuchsutensilien und technische Hilfe bei den Experimenten möchte ich Frau Gabi Cuny sehr danken.

Schließlich sage ich meiner Familie Dank, die immer für mich da war, und die mir zu dem half, was ich heute bin. Besonderer Dank gilt meinem Vater, der mir mit sprachlicher Kompetenz bei der Textverarbeitung zur Seite stand.

Zuletzt möchte ich der Liebe meines Lebens, meinem Ehemann, Eddy Bertrand Tchunte Noumsi, danken. Er war und ist nicht nur der Ruhepol sowie die Inspiration meines Lebens, sondern er unterstützt mich auch im alltäglichen Leben und erleichterte mir damit diese Dissertation.

Lebenslauf

Klein, Barbara

Geburtsdatum: 13.09.1977	Geburtsort: Kulmbach
September 1983 - August 1987	Grundschule Kulmbach
September 1987 - Juli 1997	Markgraf-Georg-Friedrich-Gymnasium Kulmbach
1997	Abitur
Oktober 1997 - April 2001	Studium der Humanmedizin an der Friedrich-Schiller-Universität in Jena
April 2001 – Oktober 2003	Studium der Humanmedizin an der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität in Frankfurt am Main
November 2003 – Oktober 2004	Tätigkeit als Ärztin im Praktikum im Klinikum Offenbach
seit Oktober 2004	Tätigkeit als Assistenzärztin im Klinikum Offenbach

Jena, der 06.05.2006

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönliche Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Prof. Dr. med. Schaible, Dr. Ebersberger, Enrique Vasquez.

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, der 06.05.2006